

**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MEXICO**



**FACULTAD DE MEDICINA**

**División de Estudio de Postgrado  
e Investigación**

**INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIOS SOCIALES  
DE LOS TRABAJADORES DEL ESTADO**

**“EXPRESIÓN DE LOS SIGUIENTES MARCADORES  
INMUNOHISTOQUÍMICOS: RECEPTOR PARA FACTOR DE  
CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGFR), P53 Y KI67 EN  
GLIOBLASTOMAS MULTIFORMES”.**

**Trabajo de Investigación que presenta:  
DRA. LILY BEATRIZ ABRAHAM MALDONADO**

**Para obtener el Diploma de la Especialidad de:  
ANATOMIA PATOLOGICA**

**Asesor de Tesis  
DR. CARLOS SÁNCHEZ LARA**

**No. de registro de protocolo:  
341.2012**



**México D.F. 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.

**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MEXICO**



---

---

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DIVISIÓN DE ESTUDIO DE POSTGRADO  
E INVESTIGACIÓN**

**INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIOS SOCIALES  
DE LOS TRABAJADORES DEL ESTADO**

**“EXPRESIÓN DE LOS SIGUIENTES MARCADORES  
INMUNOHISTOQUÍMICOS: RECEPTOR PARA FACTOR DE  
CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGFR), P53 Y KI67 EN  
GLIOBLASTOMAS MULTIFORMES”.**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN QUE PRESENTA:  
DRA. LILY BEATRIZ ABRAHAM MALDONADO**

**PARA OBTENER EL DIPLOMA DE LA ESPECIALIDAD DE:  
ANATOMIA PATOLOGICA**

**ASESOR DE TESIS  
DR. CARLOS SÁNCHEZ LARA**

**NO. DE REGISTRO DE PROTOCOLO:  
341.2012**



**2014**

---

DR. FÉLIX OCTAVIO MARTÍNEZ ALCALÁ  
COORDINADOR DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN

---

DR. GUILBALDO PATIÑO  
CARRANZA  
JEFE DE ENSEÑANZA

---

DRA. MARTHA EUNICE RODRÍGUEZ  
ARELLANO  
JEFE DE INVESTIGACIÓN

---

DR. LUIS CISNEROS SOTELO  
PROFESOR TITULAR

---

DR. CARLOS SÁNCHEZ LARA  
ASESOR DE TESIS

## Agradecimientos

A mis padres Lily Maldonado Salazar y José Luis Abraham Palma y a mis hermanos José Luis y Alejandro, por apoyarme en este largo camino de mi formación académica y porque a pesar de la distancia siempre están conmigo.

A mi mejor amigo, Rafael Lameda Díaz Pintos por ser mi futuro y la fortaleza que me impulsa a seguir luchando por mis sueños.

A mis maestros, el Dr. Fernando E. de la Torre Rendón y el Dr. Carlos Sánchez Lara por ser mi ejemplo profesional a seguir.

Al personal del servicio de Patología del Hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos, que me brindo todo su apoyo en estos años de mi formación y en especial a la histotecnóloga Raquel Guerrero Alquicira por realizar la inmunohistoquímica.

A mis compañeros residentes, Lourdes, Luis, Guillermo y Fernando, por ser mi familia todos estos años.

Dra. Lily Beatriz Abraham Maldonado.

## Resumen

El Glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor primario más frecuente del sistema nervioso central (SNC). De hecho solo siete meses de sobrevida han sido añadidos en las últimas siete décadas. La localización del tumor impacta sobre la pobre penetración de las drogas para cruzar la barrera hematoencefálica y también dentro del tumor.

Durante mucho tiempo se ha considerado que el tratamiento del Glioblastoma multiforme es de índole paliativo, sin esperanza de cura, convirtiéndose en una patología de significativa mortalidad.

Ocurre más frecuentemente en la raza negra, latinos y asiáticos; se pueden diferenciar básicamente dos tipos: *de novo o lesión tipo II*, que se manifiesta tardíamente con una media de 55 años y una historia clínica de corta duración y *el secundario o también producto de progresión*, que afecta principalmente a personas jóvenes con una media de 40 años y que se origina de la progresión histológica de una lesión de menor grado (II, III) hasta grado IV. La evidencia ha revelado que estos dos tipos tienen diferentes vías genéticas para desarrollarse.

Histológicamente presentan múltiples patrones arquitecturales y citológicos que están en correlación con su apellido: de multiforme. Los tumores varían en un espectro de células monomórficas (incluso pequeñas) hasta células francamente pleomórficas con hiper cromatismo nuclear. Asociado se reconoce incremento de la actividad mitótica, proliferación endotelial vascular con patrón glomeruloide y necrosis, esta última casi siempre en patrón de empalizada. Resulta interesante que a pesar de las propiedades altamente invasivas y proangiogénicas del Glioblastoma, éste no ocasiona metástasis fuera del sistema nervioso.

Con la finalidad de mejorar la sobrevida de los pacientes, se ha estudiado la genética de estos tumores, en donde se incluyen mutaciones, sobreexpresión y pérdidas cromosómicas en diferentes genes, incluyendo p53 y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), los cuáles contribuyen tanto a su aparición, así como a su naturaleza agresiva y progresiva.

Aproximadamente el 50-60% de los Glioblastomas tienen una expresión positiva en la marcación de p53 y del receptor del factor de crecimiento epidérmico; se ha observado también que los Glioblastomas con aumento de la expresión de estos 2 marcadores tienen un pronóstico más desfavorable.

Las mutaciones en el gen p53 y la inmunorreactividad positiva a la proteína p53 suele ser más frecuente en los Glioblastomas secundarios que en los primarios. Mientras que la inmunorreactividad para el EGFR suele ser más frecuente en los Glioblastomas primarios y menos frecuente en los secundarios.

La base del tratamiento es la cirugía, sin embargo, no se ha logrado la curación del paciente. Debido a que el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) tiene un papel importante en el desarrollo de este tumor, resulta lógico que se utilice como blanco terapéutico enfocándose en el inhibidor de la tirosina cinasa que actúa como su antagonista.

Con objeto de corroborar la expresión de los marcadores inmunohistoquímicos en el Glioblastoma multiforme, se seleccionaron 30 casos del archivo del Servicio de Patología de nuestro hospital diagnosticados entre Mayo del 2012 y Junio del 2013, se corroboró el diagnóstico histopatológico por dos patólogos, se eliminaron 5 casos por no contar con material suficiente para su estudio adicional y posteriormente se realizaron nuevos cortes histológicos para realizar tinciones técnicas de inmunohistoquímica usando los siguientes anticuerpos: receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), p53 y Ki67 (MIB-1).

Encontramos que de los 25 casos, 23 de ellos mostraron bajos índices de proliferación celular (Ki67 <25%), 2 de ellos índices intermedios de proliferación celular (Ki67 26-50%). En cuanto a la inmunomarcación con el p53 de los 25 casos, 22 mostraron una marcación  $\leq 50\%$  y 3 una marcación  $\geq 50\%$ . Respecto al EGFR, de los 25 casos, 19 mostraron una expresión  $\leq 50\%$ , 16 de ellos fueron negativos (0%) y 3 con expresión del 5-40%; 6 casos tuvieron una expresión  $\geq 50\%$  con rangos del 55-80%. Se evaluó la positividad del EGFR también por el "*Scoring of the EGFR (HER 1) test*" y se obtuvieron 5 casos con positividad 3+, 3 casos con positividad 2+, un caso con positividad 1+ y 16 casos negativos.

Se observó una relación inversa ya que aquellos casos con una expresión mayor de p53 tenían una positividad escasa o nula al EGFR y los que tenían una expresión intensa del EGFR tenían por el contrario una baja expresión del p53.



## Abstract

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common primary tumor in the central nervous system (CNS). In fact, only seven months of survival have been added in the last seven decades. The location of the tumor impacts on the poor penetration of drugs to cross the blood-brain barrier as well as into the tumor.

For a long time it has been considered that the treatment of Glioblastoma multiforme is palliative in nature, with no hope of cure, becoming a disease of significant mortality.

It occurs more frequently in Blacks, Hispanics and Asians; two types can be basically distinguished: *de novo or type II lesion*, which manifests late, with an average of 55 years and a short clinical history *and the secondary or also product of progression*, that mainly affects young people with an average age of 40 years and that originates from the histological progression from lower grade lesion (II, III) to grade IV. Evidence has shown that these two types have different genetic pathways to develop.

Histologically have multiple architectural and cytological patterns that are correlated with its surname: Multiforme. The tumors vary in a spectrum of monomorphic cells (even small) to frankly pleomorphic cells with nuclear hyperchromasia. Associated, it is recognized an increase in mitotic activity, vascular endothelial proliferation with glomeruloid pattern and necrosis, the latter almost always recognized a palisade pattern. Interestingly, despite the highly invasive glioblastoma proangiogenic properties, it does not cause metastasis outside the nervous system.

In order to improve the survival of patients, we have studied the genetics of these tumors, where mutations, overexpression and chromosomal loss include different genes, including p53 and the receptor of epidermal growth factor (EGFR), which contribute so much to its appearance and its aggressive and progressive nature.

Approximately 50-60% of Glioblastomas has a positive expression of p53 and the receptor of epidermal growth factor; it has also been reported that the Glioblastomas with an increased expression of these two markers have a unfavorable prognosis.

Mutations in the p53 gene and positive immunoreactivity for p53 protein are usually more common in secondary than in primary Glioblastomas. While immunoreactivity for EGFR is usually more common in primary Glioblastomas and less frequent in the secondary.

The mainstay of treatment is surgery, however, has not been able to cure the patient. Because the receptor of epidermal growth factor (EGFR) plays an important role in the development of the tumor, it is used as a logical therapeutic target by focusing on tyrosine kinase inhibitor that acts as its antagonist.

In order to confirm the expression of immunohistochemical markers in Glioblastoma multiforme, 30 cases from the Pathology Department of our hospital diagnosed between May 2012 and June 2013 were selected; histopathological diagnosis by two pathologists was confirmed, 5 cases were removed by not have enough material for additional study, and subsequently new histological sections for staining by immunohistochemistry using the following antibodies: receptor of epidermal growth factor (EGFR), p53 and Ki67 (MIB-1).

It was found that of the 25 cases, 23 of them showed low rates of cell proliferation (Ki67 <25%), 2 of them intermediate rates of cell proliferation (Ki67 26-50%). Regarding p53 immunostaining of the 25 cases, 22 showed a marking  $\leq 50\%$ , and 3 a marking  $\geq 50\%$ . With respect to the EGFR, of the 25 cases, 19 showed an expression  $\leq 50\%$ , 16 of them were negative (0%) and 3 with expression of 5-40%, 6 cases had an expression  $\geq 50\%$  with ranges of 55-80 %. EGFR positivity was also assessed by the "*Scoring of the EGFR (HER 1) test*" and 5 cases were obtained with a positive 3+, 3 cases a positive 2+, one case with a positive 1+ and 16 cases were negative.

An inverse relationship was observed for those cases with increased expression of p53 had little or no expression of EGFR and those with a strong expression of EGFR instead have a low expression of p53.

## Índice

Introducción	2
Material y método	7
Resultados	9
Discusión	21
Conclusiones	23
Bibliografía	24

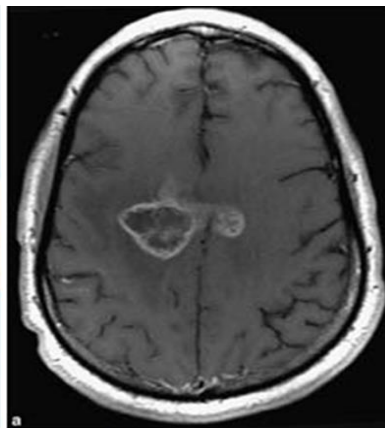
## Introducción

El Glioblastoma multiforme es el tumor primario del sistema nervioso central (SNC) más frecuente en hombres. Su incidencia en Europa oscila entre 3 y 4 casos por 100.000 habitantes, y representa 25% de todos los tumores del SNC y 50% de los tumores primarios. Su pico de aparición va desde la quinta hasta la séptima década de la vida, con una presentación en forma bimodal. Es más frecuente en hombres que en mujeres y se ha visto que su incidencia es mayor en países desarrollados. Los síntomas son atribuibles a la región del SNC que se afecte principalmente, pero generalmente son los de una masa con rápida expansión. Menos del 3% de todos los pacientes con diagnóstico de Glioblastoma sobreviven más de cuatro años y la supervivencia promedio es de seis meses. Es por esta razón que la investigación de posibles tratamientos ha venido en ascenso en los últimos años [1].

En su fisiopatología, es un tumor que con mayor frecuencia afecta los hemisferios cerebrales, sobre todo los lóbulos frontal y temporal y, generalmente, es secundario a una lesión de bajo grado previamente existente. Se presenta típicamente como una masa quística con un reforzamiento en el borde, siendo una lesión radiográficamente evidente. Este tipo de neoplasia presenta un crecimiento rápido, y compromete de forma aguda a los pacientes. Macroscópicamente, a menudo aparece como una masa relativamente bien definida, aunque casi siempre hay infiltración microscópica del tumor en el parénquima adyacente. Tienen una apariencia típicamente variada, suele ser rosa-grisáceo en la periferia con zonas amarillas con necrosis central, algunos tienen hemorragia antigua o reciente [9].

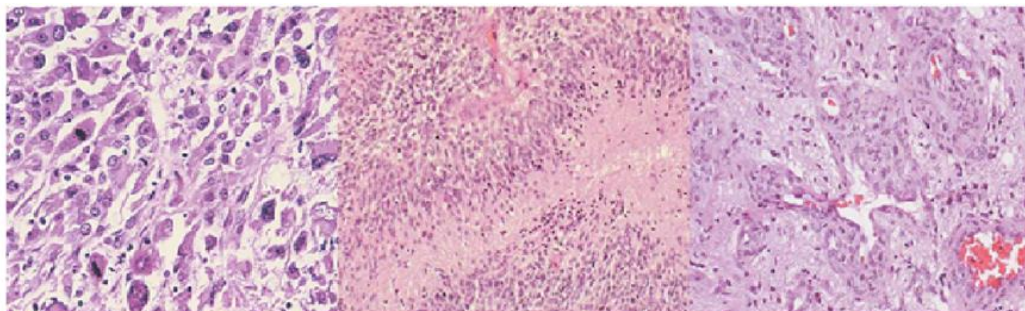


*Imagen 1*  
*Escourrolle & Poirier: Manual of*  
*Basic Neuropathology.*



*Imagen 2*  
*Cambridge Illustrated Surgical*  
*Pathology Nervous System.*

Se diferencia de los demás astrocitomas por presentar cambios histológicos característicos, como hipercelularidad, atipia nuclear marcada, mitosis atípicas, necrosis y proliferación vascular. Scherer fue el primero en clasificar, en 1940, el Glioblastoma multiforme en tumor primario o secundario [2].



*Imagen 3*  
*Escourolle & Poirier: Manual of Basic Neuropathology.*

En la actualidad, se maneja esta clasificación:

<b>Tumores astrocíticos</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>
Astrocitoma subependimario de células gigantes	•			
Astrocitoma pilocítico	•			
Astrocitoma pilomixoide		•		
Astrocitoma difuso		•		
Xantoastrocitoma pleomórfico		•		
Astrocitoma anaplásico			•	
Glioblastoma				•
Glioblastoma de células gigantes				•
Gliosarcoma				•

*Tabla 1.*  
*WHO Classification, 2004.*

La base del tratamiento es la cirugía pero, a pesar de las amplias resecciones que se realizan para extirpar el tumor, no se ha visto que lleve a la curación del paciente. Hace algunos años se implementó la radioterapia como terapia coadyuvante y los estudios recientes apoyan la quimioterapia, en especial, la temozolamida (agente alquilante), cuando el paciente presenta recidivas tumorales. Estas dos terapias han aumentado la supervivencia de los pacientes, de 6 a 12 meses [3].

El *Glioblastoma primario* es un tumor que aparece *de novo* y sólo representa el 1% de este tipo de neoplasias. Aparece característicamente después de la quinta década y se puede ver con frecuencia en síndromes como la neurofibromatosis de tipo 1, von Hippel Lindau y Li-Fraumeni.

El tipo de Glioblastoma más frecuente es el *secundario*. Se diferencia del primario básicamente por su aparición, ya que el secundario es causado por una disminución en la diferenciación celular del astrocitoma de bajo grado y es más frecuente en población joven [4].

Los subtipos relacionados con dichos síndromes son histológicamente indistinguibles, el análisis genético molecular sugiere que son, al menos, dos vías distintas las que contribuyen a la génesis tumoral [4]. El Glioblastoma multiforme *primario* frecuentemente muestra amplificación, aumento de la expresión o ambos, del receptor del factor de crecimiento epidérmico (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR), mutaciones de PTEN (delección del cromosoma 10 para el homólogo de la fosfatasa y la tensina) y pérdida parcial o completa del cromosoma 10. Por el contrario, el Glioblastoma multiforme *secundario* generalmente se caracteriza por mutaciones del gen p53, aumento de la expresión del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (Platelet-derived Growth Factor Receptor PDGF-R) y pérdida de la heterocigocidad de 17p, 19q y 10q [5].

Por lo tanto, la amplificación, el aumento de la expresión o ambos, del EGFR y la mutación de p53 son dos características que podrían llevar a diferenciar estas dos neoplasias.

*Jha et al.* y *Ying et al.* realizaron estudios con las técnicas FISH (Fluorescent in situ hybridization) y PCR (polymerase chain reaction), con las cuáles lograron demostrar que las mutaciones de p53 y la amplificación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) coexistían en los Glioblastomas primarios. Por esta razón, queda la incógnita de cómo diferenciar los dos tumores. Otro tipo de fenómeno visto en ambos tumores es la alteración de los genes que codifican para proteínas involucradas en el control de transición del ciclo celular en G-S, pero, en el caso del MDM2 (mouse double minute 2), ciclina dependiente de las cinasas (CDK) 4 y 6 (CDK4 y CDK6), y el inhibidor de la ciclina dependiente de la cinasa p21, sí se han visto diferencias. Mientras la coamplificación de MDM2 y CDK se ha observado en gliomas, la amplificación, el aumento de la expresión o ambos, de MDM2 se encuentran con mayor frecuencia en Glioblastomas multiformes primarios que en los secundarios, y además, la amplificación de CDK4 se encuentra con mayor

frecuencia en el secundario y es un marcador que aparece de forma tardía y surge en los pacientes con cifras menores de supervivencia, lo que significa que es un factor de mal pronóstico [5].

Hecha esta evaluación sobre las características genéticas y moleculares del Glioblastoma multiforme, podemos revisar los últimos avances y estudios realizados, dirigidos a mejorar la supervivencia con terapias novedosas basadas en marcadores tumorales, genética y estructuras moleculares [8]. Como mencionamos anteriormente, el receptor del factor de crecimiento epidérmico tiene un importante papel en el desarrollo de este tumor y, más específicamente, en su tratamiento, ya que dicho receptor se encuentra amplificado en 40% a 50% y muestra un aumento de su expresión en más de 60% de los casos [7].

Las mutaciones del receptor del factor de crecimiento epidérmico ocurren en alrededor de 50% de los Glioblastomas multiformes con amplificación de dicho receptor, lo que resulta en el EGFRVIII, una variante del receptor original, que es activado constitutivamente por continuas olas de señales. Por esta razón, éste es un blanco lógico para muchos estudios clínicos. La mayoría de estos estudios se enfocan en el inhibidor de la tirosina cinasa (tyrosine kinase inhibitor, TKI), que actúa como antagonista competitivo del dominio intracelular del receptor del factor de crecimiento epidérmico [8].

Otra publicación que generó controversia acerca de las diferentes mutaciones de estas neoplasias fue realizada por *Idbaih et al.*, quienes publicaron que los tumores de bajo grado que presentaban recidivas como Glioblastomas, generalmente, mantenían su p53 intacto y eran negativos inmunológicamente. Estos hallazgos indican que los astrocitomas de bajo grado que evolucionan a grados más indiferenciados, lo hacen a través de dos vías: la primera, a astrocitomas anaplásicos y, posteriormente, a Glioblastomas con p53 mutado, y la otra, directamente a Glioblastomas con p53 no mutado [9].

Por otra parte en un estudio realizado en Barcelona denominado "*Worse outcome in primary Glioblastoma multiforme with concurrent epidermal growth factor receptor and p53 alteration*", entre los años 1999 y 2008, evaluó 194 pacientes con diagnóstico de Glioblastoma primario, los cuáles se sometieron a cirugía para resección tumoral. Encontraron receptor del factor de crecimiento

epidérmico en 51% y se identificó la mutación p53 en 11.2% de los especímenes. La combinación de estos dos marcadores se encontró en 60% de los especímenes que marcaron positivo para p53 [4].

Las conclusiones se enfocaron en describir cuál de los factores anteriormente nombrados generaba una diferencia significativamente estadística en la supervivencia de los pacientes. Los hallazgos en relación con los marcadores mostraron que los Glioblastomas con aumento de la expresión de EGFR y presencia de p53 tenían un pronóstico más pobre [4].

Los estudios mencionados anteriormente buscan encontrar una relación entre ciertas mutaciones genéticas, presentes en este tipo de neoplasias, y el porcentaje de respuesta a la terapia convencional.

No se ha encontrado en la literatura un estudio que compare la relación los dos marcadores antes mencionados con el Ki67, siendo este un marcador no específico que determina alta tasa de proliferación celular.

Los marcadores inmunohistoquímicos que se realizaran en esta investigación serán:

**-Ki67:** Es un anticuerpo monoclonal que detecta un antígeno nuclear que se expresa en las células que entran en el ciclo celular, proporcionando una medida directa de la fracción de crecimiento del tejido, ya que es un marcador del ciclo celular y del crecimiento tumoral.

**-EGFR:** (Receptor del factor de crecimiento epidérmico): Glicoproteína transmembrana involucrada en mecanismos implicados en el crecimiento, diferenciación y proliferación celular. Se une al factor de crecimiento epidérmico, para inducir la división celular. Pertenece a la familia de receptores del factor de crecimiento con actividad tirosina-cinasa. Su positividad es en la membrana celular.

**-P53:** Gen supresor de tumores, localizado en el cromosoma 17 que induce a la apoptosis y destrucción de las células cancerosas, pero al mutar deja de ejercer el efecto protector, por lo que esas células, cuyo ADN suele estar dañado, en lugar de destruirse por apoptosis se dividen sin control, mutan rápidamente sus genes y al final se malignizan. Es una proteína que está mutada en más del 50% de los tumores. La forma normal (no mutada) de la p53 evita que la célula inicie el ciclo de división celular. Se ha hallado también que ocasiona la muerte celular (apoptosis) después de haberse dañado el ADN. Su positividad es nuclear.



## Material y métodos:

Se trata de un estudio observacional, prospectivo y descriptivo.

Se realizó la búsqueda de los productos de biopsias de cerebro con diagnóstico histopatológico de Glioblastoma multiforme en la base de datos del servicio de Patología quirúrgica del Hospital Lic. Adolfo López Mateos, ISSSTE, México, Distrito Federal, durante el periodo comprendido entre Mayo del 2012 a Junio del 2013, y se obtuvieron un total de 30 casos que fueron incluidos para este estudio. Todas las biopsias fueron fijadas en formol, se valoró si se contaba con el material completo (laminillas y bloques de parafina) y se procesaron por método histológico de rutina, teñidas con hematoxilina y eosina.

Se analizó que de las biopsias seleccionadas, éstas contarán con tejido neoplásico suficiente, se corroboró que el diagnóstico inicial histopatológico de Glioblastoma fuera correcto de acuerdo a los siguientes criterios: astrocitos con anaplasia, hiper celularidad, mitosis atípicas, empalizada, necrosis extensa y vasos glomeruloides; posteriormente, se realizaron nuevos cortes y se aplicaron en cada una de las biopsias seleccionadas los siguientes marcadores de inmunohistoquímica: receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), p53 y Ki67, analizando su expresión (porcentaje de expresión y *Scoring of the EGFR (HER-1) test*), se usó en cada uno de los marcadores un control interno y externo; finalmente se analizaron los resultados para verificar si éstos corresponden a lo reportado en la literatura.

El porcentaje de expresión de los tres marcadores fue evaluado por dos patólogos del servicio quienes interpretaron el resultado de manera independiente, se obtuvo un promedio de ambos el cual se consideró como resultado definitivo.

La marcación del p53 y Ki67 se consideró positiva cuando se encontraba en el núcleo de las células neoplásicas. En cuanto al EGFR se valoró su positividad en la membrana celular.

Scoring of the EGFR (HER 1) test		
Puntaje	Intensidad en la membrana celular	% de células positivas
0	Sin tinción	0
1+ (Positivo)	Débil	≥1%
2+ (Positivo)	Moderada	≥1%
3+ (Positivo)	Intensa	≥1%

*Tabla 2. Lester S. Manual of Surgical Pathology. 2010.*

Nota: El servicio de Patología del Hospital cuenta con los tres marcadores de inmunohistoquímica previamente mencionados (p53, receptor del factor de crecimiento epidérmico y Ki67) para la realización del estudio.

**Resultados:**

Se obtuvo un total de 30 de casos con diagnóstico de Glioblastoma multiforme, de los cuales 5 fueron descartados por tener material neoplásico insuficiente para realizar inmunohistoquímica.

En la siguiente tabla de recolección de datos se muestra el total de casos y sus resultados:

	Número de quirúrgico	Laminillas		Bloques		Suficiente		Buen estado		EGFR	P53	Ki67
		Sí	No	Sí	No	Sí	No	Sí	No	Porcentaje	Porcentaje	Porcentaje
										Scoring test		
1	130-07	X		X			X	X		----	----	----
2	476-07	X		X		X		X		70% 3+	5%	5%
3	5543-08	X		X			X	X		----	----	----
4	33-TO2-09	X		X			X	X		----	----	----
5	2518-D-09	X		X		X		X		0% 0	60%	10%
6	3010-C-09	X		X		X		X		0% 0	50%	5%
7	6124-B-09	X		X		X		X		0% 0	80%	20%
8	6633-09	X		X		X		X		80% 3+	30%	10%
9	6693-09	X		X		X		X		0% 0	10%	15%
10	9193-09	X		X		X		X		0% 0	40%	5%
11	9415-09	X		X		X		X		60% 2+	10%	20%
12	755-10	X		X		X		X		0% 0	5%	5%
13	4913-C-10	X		X		X		X		0% 0	25%	10%
14	6494-10	X		X		X		X		0% 0	5%	3%
15	7960-10	X		X		X		X		0% 0	30%	10%
16	8652-T0-10	X		X		X		X		0% 0	1%	3%
17	29-B-11	X		X		X		X		0% 0	60%	10%
18	653-11	X		X		X		X		0% 0	10%	10%

19	4541-E-11	X		X		X		X		80% 3+	10%	5%
20	5593-11	X		X		X		X		55% 3+	5%	10%
21	7587-B-11	X		X		X		X		0% 0	10%	15%
22	7436-C-12	X		X		X		X		0% 0	50%	35%
23	151-A-13	X		X		X		X		40% 2+	10%	20%
24	723-B-13	X		X		X		X		5% 1+	25%	5%
25	1865-B-13	X		X		X		X		40% 2+	10%	15%
26	2740-B-13	X		X		X		X		0% 0	40%	30%
27	4031-A-13	X		X		X		X		70% 3+	1%	3%
28	6381-C-13	X		X		X		X		0% 0	20%	5%
29	6541-13	X		X			X	X		-----	-----	-----
30	52-C-14	X		X		X		X		----	----	----

Tabla 3.

Fuente: Servicio de Patología del Hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos, ISSSTE.

En cuanto al Ki67, contrario a lo esperado, debido a la agresividad de esta neoplasia, de los 25 casos, 23 de ellos tuvieron índice de proliferación celular bajo con porcentajes del 3-20% de positividad; los 2 casos restantes expresaron índices de proliferación intermedio con porcentajes del 30-35%.

	Número de quirúrgico	Ki67 <25% Bajo índice de proliferación celular	Ki67 26-50% Índice intermedio de proliferación celular	Ki67 >50% Alto índice de proliferación celular
1	476-07	5%		
2	2518-D-09	10%		
3	3010-C-09	5%		
4	6124-B-09	20%		
5	6633-09	10%		
6	6693-09	15%		
7	9193-09	5%		
8	9415-09	20%		
9	755-10	5%		

10	4913-C-10	10%		
11	6494-10	3%		
12	7960-10	10%		
13	8652-T0-10	3%		
14	29-B-11	10%		
15	653-11	10%		
16	4541-E-11	5%		
17	5593-11	10%		
18	7587-B-11	15%		
19	7436-C-12		35%	
20	151-A-13	20%		
21	723-B-13	5%		
22	1865-B-13	15%		
23	2740-B-13		30%	
24	4031-A-13	3%		
25	6381-C-13	5%		

Tabla 4.

Fuente: Servicio de Patología del Hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos, ISSSTE.

De los 25 casos, 22 de ellos tuvieron una expresión del p53  $\leq 50\%$  con porcentajes del 1-50%; los 3 casos restantes tuvieron una expresión del p53  $\geq 50\%$  con porcentajes del 60-80%.

	Número de quirúrgico	p53 ( $\leq 50\%$ )	p53 ( $\geq 50\%$ )
1	476-07	5%	
2	2518-D-09		60%
3	3010-C-09	50%	
4	6124-B-09		80%
5	6633-09	30%	
6	6693-09	10%	
7	9193-09	40%	
8	9415-09	10%	
9	755-10	5%	
10	4913-C-10	25%	
11	6494-10	5%	
12	7960-10	30%	
13	8652-T0-10	1%	
14	29-B-11		60%
15	653-11	10%	
16	4541-E-11	10%	
17	5593-11	5%	
18	7587-B-11	10%	
19	7436-C-12	50%	

<b>20</b>	151-A-13	10%	
<b>21</b>	723-B-13	25%	
<b>22</b>	1865-B-13	10%	
<b>23</b>	2740-B-13	40%	
<b>24</b>	4031-A-13	1%	
<b>25</b>	6381-C-13	20%	

*Tabla 5.*

*Fuente: Servicio de Patología del Hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos, ISSSTE.*

Se evaluó la positividad del EGFR por el “Scoring of the EGFR (HER 1) test” y se obtuvieron 5 casos con positividad 3+, 3 casos con positividad 2+, un caso con positividad 1+ y 16 casos negativos.

	Número de quirúrgico	EGFR 0	EGFR 1+	EGFR 2+	EGFR 3+
<b>1</b>	476-07				X
<b>2</b>	2518-D-09	X			
<b>3</b>	3010-C-09	X			
<b>4</b>	6124-B-09	X			
<b>5</b>	6633-09				X
<b>6</b>	6693-09	X			
<b>7</b>	9193-09	X			
<b>8</b>	9415-09			X	
<b>9</b>	755-10	X			
<b>10</b>	4913-C-10	X			
<b>11</b>	6494-10	X			
<b>12</b>	7960-10	X			
<b>13</b>	8652-T0-10	X			
<b>14</b>	29-B-11	X			
<b>15</b>	653-11	X			
<b>16</b>	4541-E-11				X
<b>17</b>	5593-11				X
<b>18</b>	7587-B-11	X			
<b>19</b>	7436-C-12	X			
<b>20</b>	151-A-13			X	
<b>21</b>	723-B-13		X		
<b>22</b>	1865-B-13			X	
<b>23</b>	2740-B-13	X			
<b>24</b>	4031-A-13				X
<b>25</b>	6381-C-13	X			

*Tabla 6.*

*Fuente: Servicio de Patología del Hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos, ISSSTE.*

De los 25 casos, 19 casos tuvieron una expresión del EGFR  $\leq 50\%$ , de éstos 16 fueron negativos (0%), con porcentajes del 5-40% y los 6 casos restantes tuvieron una expresión del EGFR  $>50\%$  con porcentajes del 55-80%.

	Número de quirúrgico	EGFR (<50%)	EGFR (>50%)
1	476-07		70%
2	2518-D-09	0%	
3	3010-C-09	0%	
4	6124-B-09	0%	
5	6633-09		80%
6	6693-09	0%	
7	9193-09	0%	
8	9415-09		60%
9	755-10	0%	
10	4913-C-10	0%	
11	6494-10	0%	
12	7960-10	0%	
13	8652-T0-10	0%	
14	29-B-11	0%	
15	653-11	0%	
16	4541-E-11		80%
17	5593-11		55%
18	7587-B-11	0%	
19	7436-C-12	0%	
20	151-A-13	40%	
21	723-B-13	5%	
22	1865-B-13	40%	
23	2740-B-13	0%	
24	4031-A-13		70%
25	6381-C-13	0%	

Tabla 7.

Fuente: Servicio de Patología del Hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos, ISSSTE.

Marcador de inmunohistoquímica	Moda	Mediana	Promedio
Ki67	5% y 10%	10%	11%
p53	10%	10%	24%
EGFR	0%	0%	55.55%

Tabla 8.

Fuente: Servicio de Patología del Hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos, ISSSTE.

En la siguiente gráfica, se muestran los 25 casos seleccionados y su positividad al Ki67:

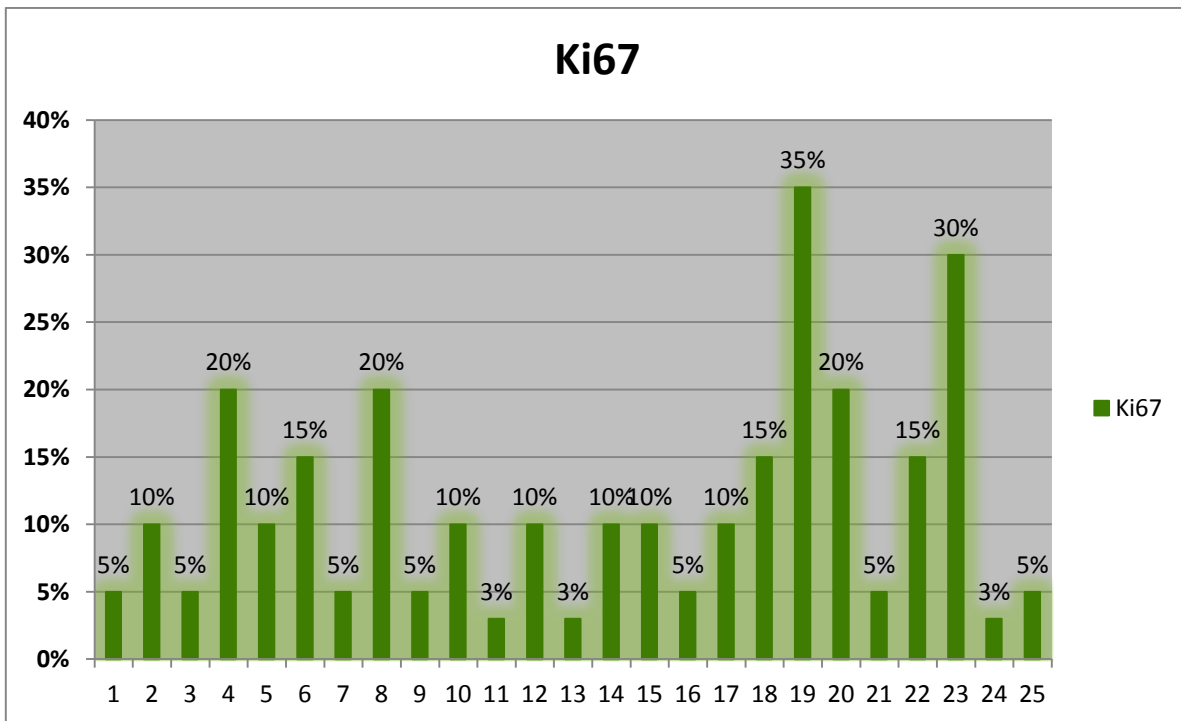


Gráfico 1.

Fuente: Servicio de Patología del Hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos, ISSSTE.

En la siguiente gráfica, se muestran los 25 casos seleccionados y su positividad al p53:

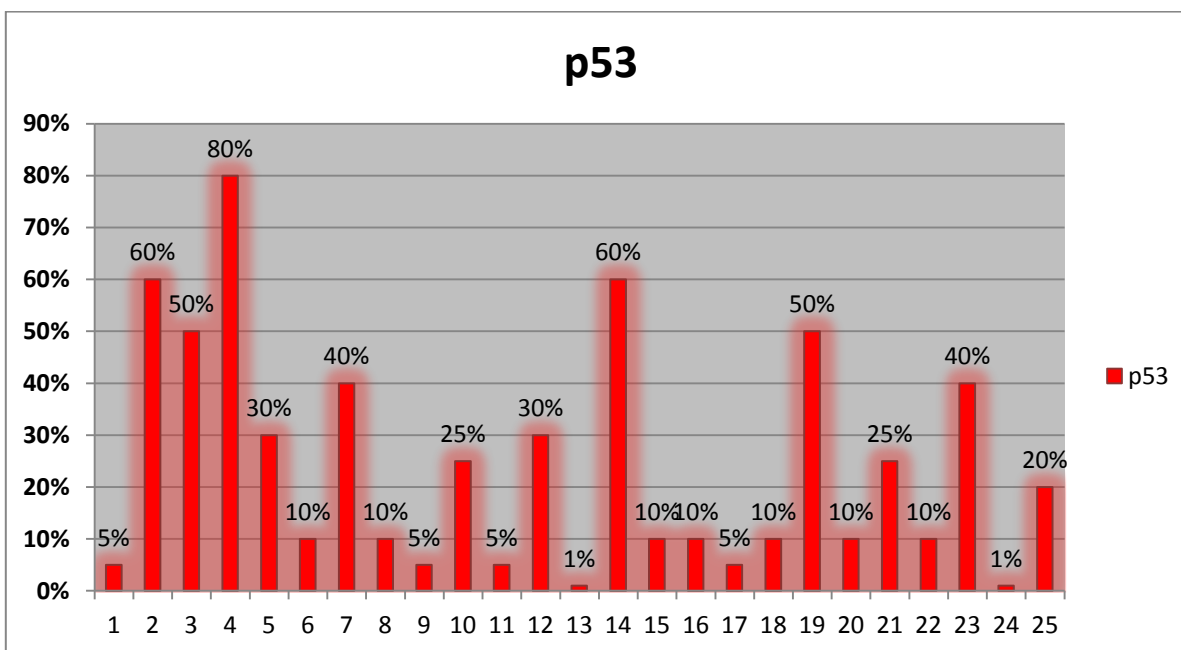


Gráfico 2.

Fuente: Servicio de Patología del Hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos, ISSSTE.



En la siguiente gráfica, se muestran los 25 casos seleccionados y su positividad al EGFR:

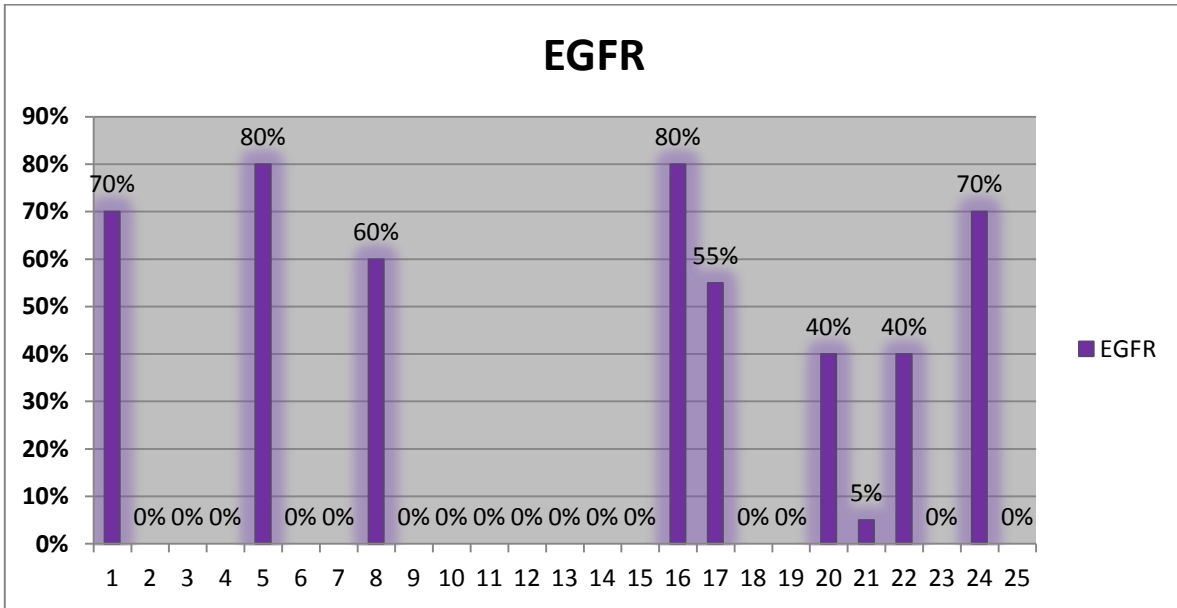


Gráfico 3.

Fuente: Servicio de Patología del Hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos, ISSSTE.

En la siguiente gráfica se observan los 25 casos y la expresión del EGFR y el Ki67, donde se ve que aquellos casos una expresión mayor de p53 tenían una positividad escasa o nula al EGFR y los que tenían una expresión intensa del EGFR tenían por el contrario una baja expresión del p53.

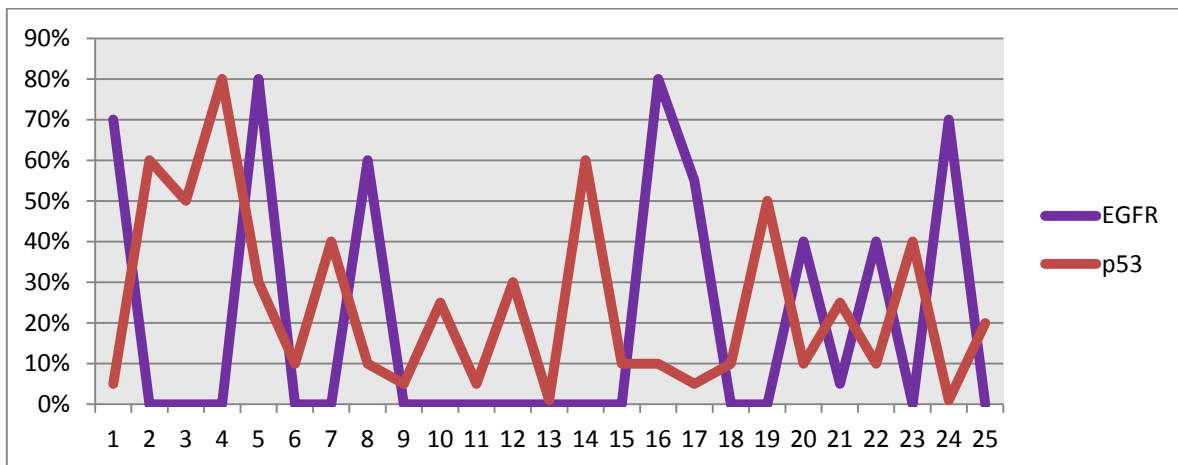


Gráfico 4.

Fuente: Servicio de Patología del Hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos, ISSSTE.

En la siguiente gráfica, se muestran los casos con positividad del p53  $\leq 50\%$  o  $\geq 50\%$ :

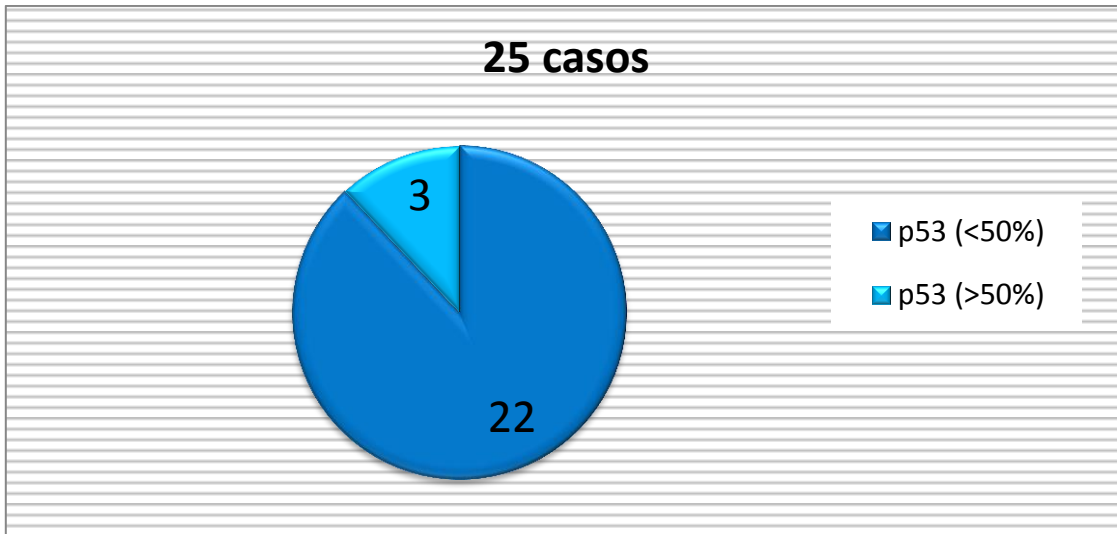


Gráfico 5.

Fuente: Servicio de Patología del Hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos, ISSSTE.

En la siguiente gráfica, se observa que 11 casos mostraron positividad mayor al 50% de un marcador, ninguno de los casos mostró positividad mayor al 50% en dos o más marcadores.

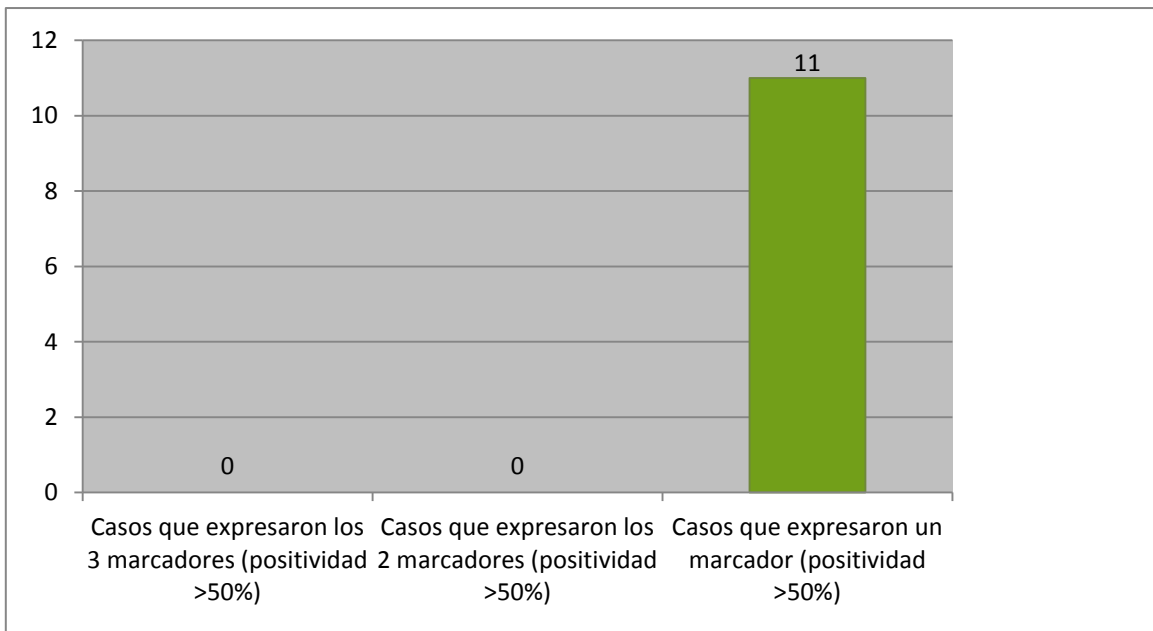


Gráfico 6.

Fuente: Servicio de Patología del Hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos, ISSSTE.

En la siguiente gráfica, se muestran los 25 casos y la positividad de los tres marcadores utilizados, EGFR, p53 y Ki67:

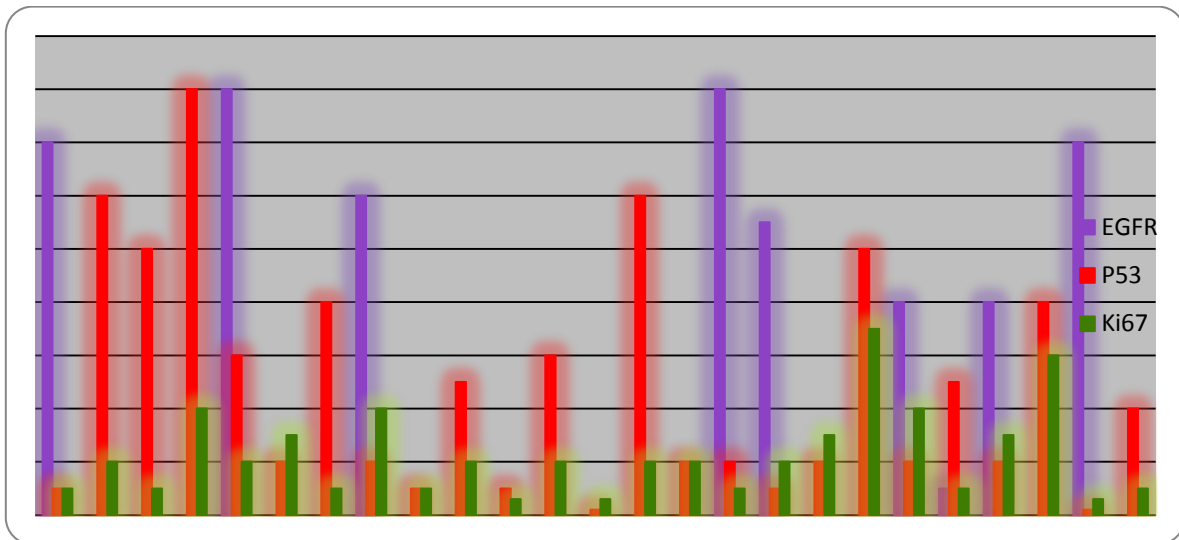


Gráfico 7.

Fuente: Servicio de Patología del Hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos, ISSSTE.

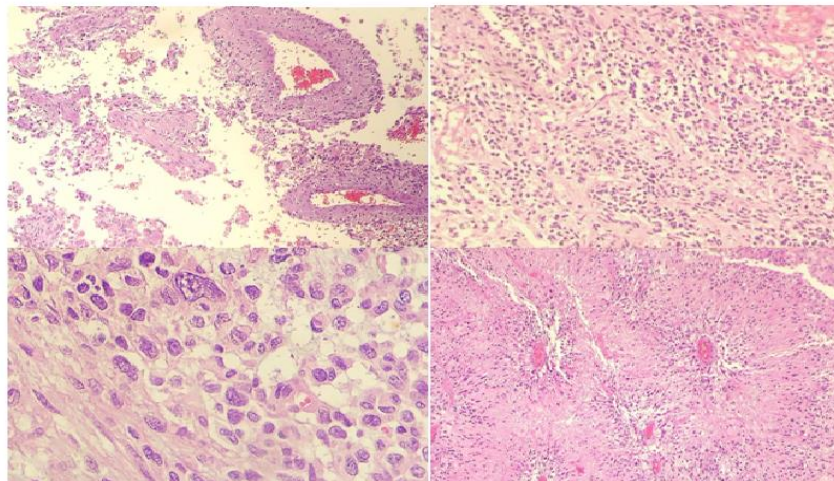
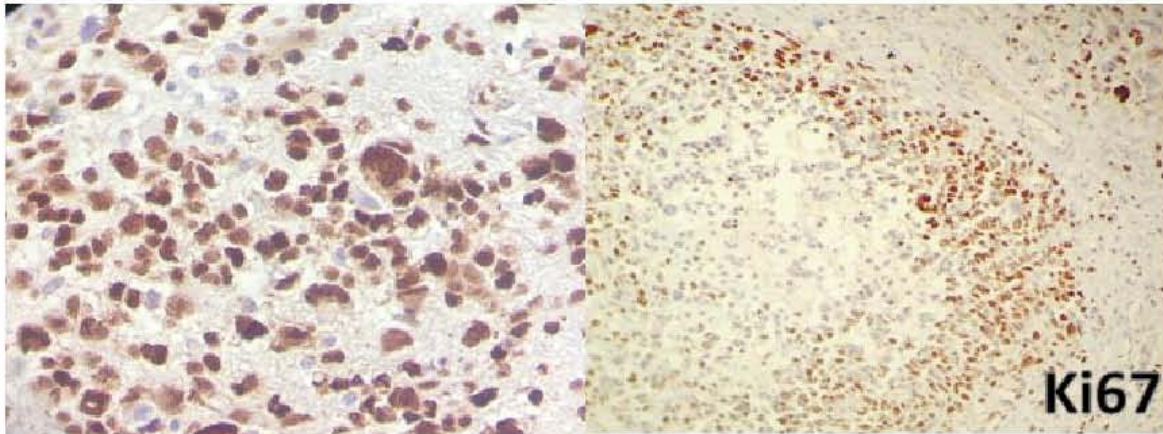
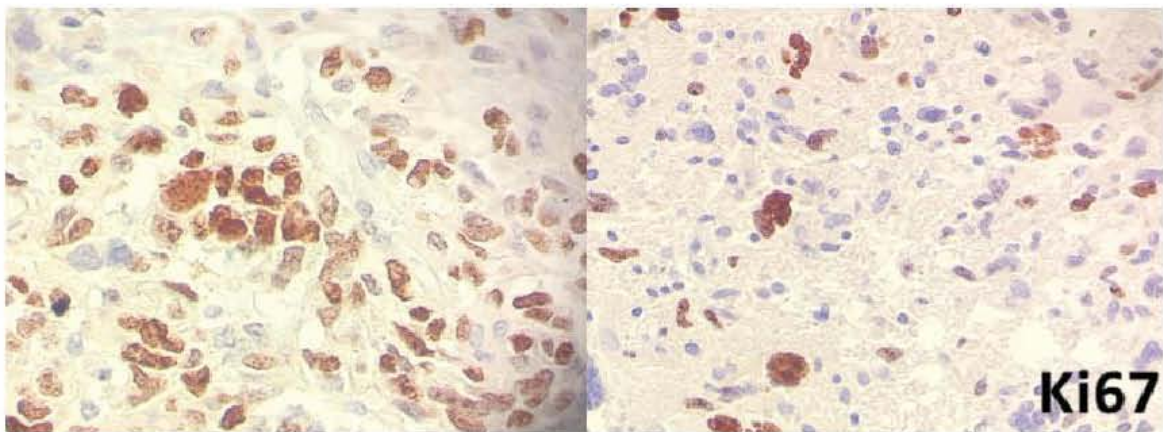


Imagen 4. Tinción de Hematoxilina y Eosina (H&E) del caso 9415. Principales características histológicas del Glioblastoma. (Daño endotelial, hiper celularidad, atipia nuclear intensa, necrosis en empalizada y mitosis atípicas (no se muestran).

A continuación se muestran casos representativos con inmunohistoquímica destacando la mayor y menor positividad con Ki67:

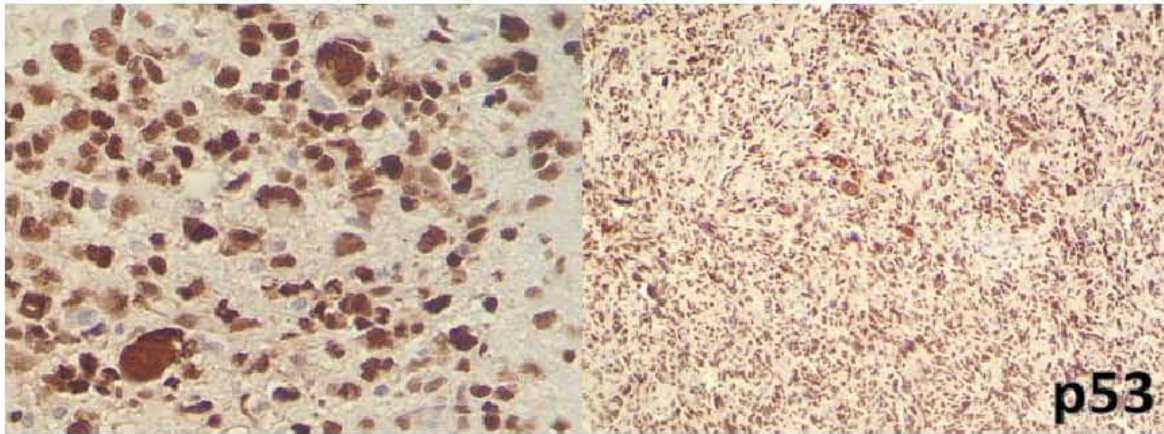


*Imagen 5*  
*Caso 7436, el cuál mostró una positividad del 30%.*



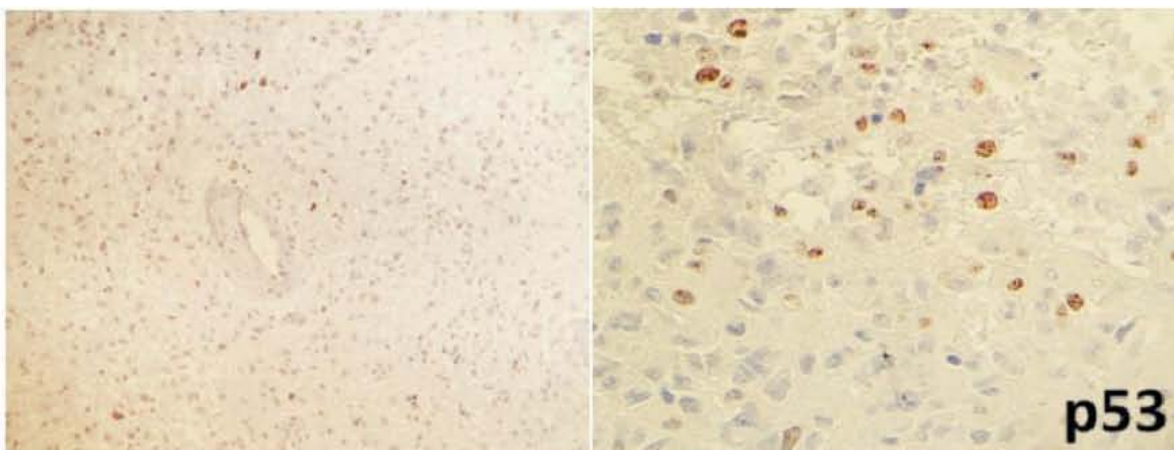
*Imagen 6*  
*Caso 3010, el cuál mostró una positividad del 5%.*

A continuación se muestran casos representativos con inmunohistoquímica destacando la mayor y menor positividad con p53:



*Imagen 7*

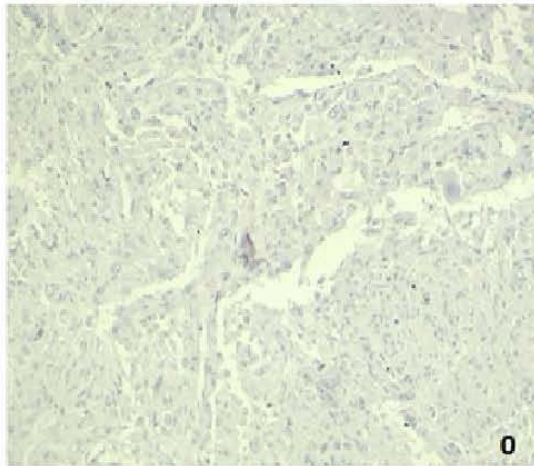
*Caso 6124, el cuál mostró una positividad del 80%.*



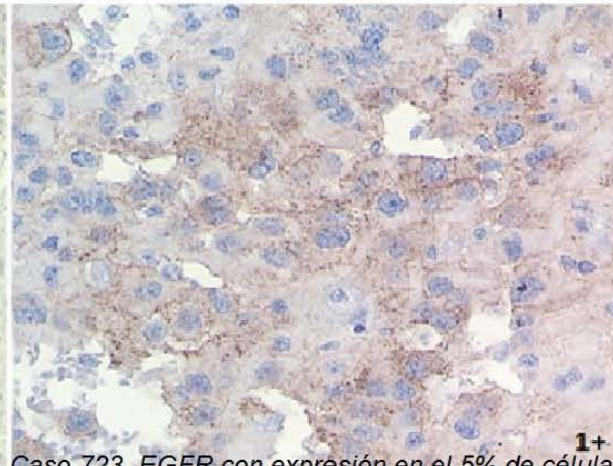
*Imagen 8*

*Caso 5593, el cuál mostró una positividad del 5%.*

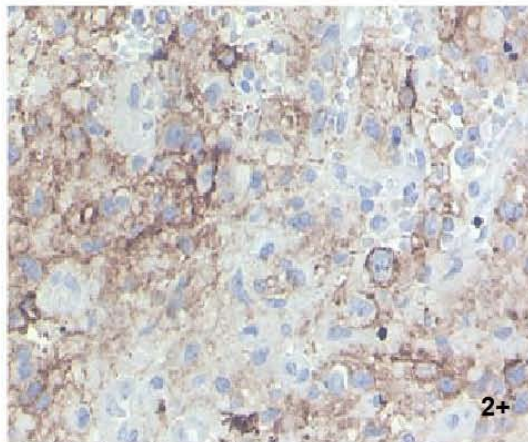
A continuación se muestran casos representativos con inmunohistoquímica destacando la positividad con EGFR:



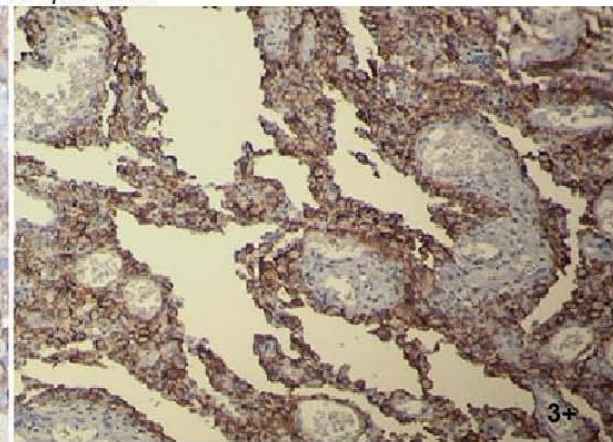
Caso 8652, EGFR sin expresión.



Caso 723, EGFR con expresión en el 5% de células neoplásicas.



Caso 151, con expresión del EGFR en el 40% de las células neoplásicas.



Caso 476, con expresión del EGFR en el 80% de las células neoplásicas.

Imagen 9

## **Discusión**

De los tumores primarios del sistema nervioso central el Glioblastoma multiforme es el glioma más frecuente y agresivo de todos. Los pacientes con diagnóstico de Glioblastoma multiforme, tienen un periodo de supervivencia muy corto al momento del diagnóstico (aproximadamente 16 meses en nuestro país).

Pueden surgir en cualquier región del sistema nervioso central, pero comúnmente en el espacio supratentorial. Típicamente muestran macroscópicamente áreas con necrosis y hemorragia. Existe una variedad de patrones microscópicos, se le ha designado como multiforme porque las células tumorales muestran un considerable pleomorfismo, pero las 2 características fundamentales son la proliferación vascular y la necrosis. La proliferación vascular se conoce como “glomeruloides” o “proliferación vascular endotelial”. La proliferación vascular incluye todos los elementos celulares de los vasos sanguíneos: endotelio, pericitos y fibroblastos. La necrosis en el Glioblastoma se caracteriza por ser en pseudoempalizada. Este fenómeno comienza como un pequeño foco de necrosis hipóxica atribuible a una trombosis microvascular.

Actualmente y con la finalidad de mejorar la supervivencia de estos pacientes, se ha estudiado la genética de estos tumores, en donde se incluyen mutaciones, sobreexpresión y pérdidas cromosómicas en diferentes genes, incluyendo p53, el receptor del factor de crecimiento epidérmico, el gen del factor de crecimiento alfa derivado de plaquetas, el gen p16, entre otros; los cuales contribuyen tanto a su aparición, así como a su naturaleza agresiva y progresiva, con pobre respuesta a los tratamientos convencionales como la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia.

Además el 50-60% de los Glioblastomas tienen una expresión positiva en la marcación de p53 y del receptor del factor de crecimiento epidérmico; en este estudio encontramos que el 100% de los casos mostraron positividad al p53 (con rangos del 1-80% y un promedio de 24%), en el caso del EGFR el 36% mostraron positividad (con rangos del 5-80% y un promedio de 55.55%); se ha observado también que los Glioblastomas con aumento de la expresión de estos 2 marcadores tienen un pronóstico más pobre. Existen publicaciones que afirman que los astrocitomas de bajo grado que presentan recidivas como Glioblastomas, generalmente mantienen su p53 intacto y son negativos inmunohistoquímicamente. Lo que indica que los astrocitomas de bajo grado

evolucionan hacia grados más indiferenciados, indicando que existen dos vías genéticas diferentes que conducen al desarrollo del Glioblastoma: la primera a astrocitomas anaplásicos y posteriormente, a Glioblastomas con p53 mutado; y la otra directamente a Glioblastomas con p53 no mutado.

Las mutaciones en el gen p53 y la inmunorreactividad positiva a la proteína p53 suele ser más frecuente en los glioblastomas secundarios que en los primarios. Mientras que la inmunorreactividad para el EGFR suele ser más frecuente en los Glioblastomas primarios y menos frecuente en los secundarios.

La base del tratamiento es la cirugía, pero a pesar de las resecciones amplias que se realizan para la extirpación del tumor, no se ha logrado la curación del paciente. Debido a que el receptor del factor de crecimiento epidérmico tiene un papel importante en el desarrollo de este tumor, resulta lógico que se utilice como blanco terapéutico enfocándose en el inhibidor de la tirosina cinasa que actúa como un antagonista del EGFR.



## Conclusiones

Este trabajo evalúa la frecuencia de expresión de los marcadores (EGFR, p53 y Ki67) utilizando inmunohistoquímica, debido al conocimiento que se tiene de las mutaciones genéticas presentes en el Glioblastoma.

Al evaluar la expresión de estos tres marcadores observamos que en la literatura no existen parámetros bien definidos de cuanto es el porcentaje del p53 para considerar que se encuentra sobreexpresado en los Glioblastomas; de igual manera, valorar la expresión del EGFR fue un obstáculo, ya que la única forma es a través del "*Scoring of the EGFR (HER 1) test*", sin embargo, éste no es específico para los Glioblastomas. Sería de utilidad realizar nuevos estudios para llegar a un acuerdo y lograr determinar los rangos de sobreexpresión.

En cuanto al Ki67, no existen en la actualidad estudios que reportan la expresión de este marcador en los Glioblastomas; sin embargo, lo esperado es que debido a la alta agresividad de estos tumores mostrarán altos índices de proliferación celular; pero ninguno de los casos tuvo índices altos.

El futuro de la terapia utilizando antagonistas del receptor del factor de crecimiento epidérmico en el abordaje de los gliomas de alto grado, se dirige a transformar los marcadores tumorales en un punto a favor en el tratamiento de esta neoplasia, ya que, a pesar de los grandes esfuerzos que se han hecho para prolongar el tiempo de recaída y el tiempo de supervivencia, se ha fracasado.

Por esta razón, al utilizar un tratamiento dirigido se pretende alcanzar un mayor beneficio, mejoría en la calidad de vida y aumento en el tiempo de supervivencia de los pacientes. El conocer ampliamente sobre el proceso patológico del Glioblastoma y sus características genéticas podría ocasionar el éxito en el tratamiento de estos tumores y llegar así a la introducción de la terapia génica como tratamiento estándar en el tratamiento de esta neoplasia.

## Referencias Bibliográficas:

1. De Angelis LM. Brain Tumor. *N Eng J Med*. 2001;344:114.
2. Scherer H. The forms of growth in Gliomas and their practical significance *Brain*. 1940;40:631-5.
3. Teixeira MM, García I, Portela I, Cernuda M, Oliveira C, Albano J, et al. Temozolomide in second-line treatment after prior nitrosurea-based chemotherapy in glioblastoma multiforme: experience from a Portuguese institution. *Int J Clin Pharmacol Res*. 2002; 22:19-22.
4. Perry A, Anderl K, Borell TJ, Kimmel DW, Wang CH, O'Fallon JR, Feuerstein BG, Scheithauer BW, Jenkins RB. Detection of p16, RB, CDK4, and p53 gene deletion and amplification by fluorescence in situ hybridization in 96 gliomas. *Am J Clin Pathol*. 1999;112: 801-9.
5. Ruano Y. Worse outcome in primary glioblastoma multiforme with concurrent epidermal growth factor receptor and p53 alteration. *Am J Clin Pathol*. 2009;131:257-63.
6. Ying H, Zheng H, Scott K, Wiedemeyer R, Yan H, Lim C, Huang J, Dhakal S, Ivanova E, Xiao Y, Zhang H, Hu J, Stommel JM, Lee MA, Chen AJ, Paik JH, Segatto O, Brennan C, Elferink LA, Wang YA, Chin L, DePinho RA. Mig-6 controls EGFR trafficking and suppresses gliomagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Apr 13;107(15):6912-7.
7. Jha P, Agarwal S. Heterozygosity status of 1p and 19q and its correlation with p53 protein expression and EGFR amplification in patients with astrocytic tumors: novel series from India. *Cancer Genet Cytogenet*. 2010;198:126-34.
8. Lassman AB, Abrey LE, Gilbert MR. Response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *N Engl J Med*. 2006;354:525-6.
9. Gray F, De Girolami U. *Manual of Basic Neuropathology*. Fourth Edition. Elsevier. 2004; 25.
10. Vogel H. *Cambridge Illustrated Surgical Pathology Nervous System*. Cambridge. 2009; 65-71.
11. Prayson R. Brain tumors. *Demosmedical*. 2010; 19-21.