



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
DELEGACIÓN SUR DEL DISTRITO FEDERAL
UMAE HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMN SIGLO XXI

TITULO

**“ANÁLISIS MOLECULAR E HISTOPATOLOGICO DEL LECHO QUIRÚRGICO EN
PACIENTES OPERADOS DE GLIOMAS DE ALTO GRADO DE MALIGNIDAD COMO
FACTORES PRONÓSTICOS DE RECURRENCIA”**

TESIS QUE PRESENTA:

DRA. ALMA ROSA GARCÍA NÁJERA
PARA OBTENER EL DIPLOMA EN LA ESPECIALIDAD DE

NEUROCIRUGÍA

ASESOR:

DRA. BARBARA NETTEL RUEDA.
NEUROCIRUJANO ADSCRITO AL MÓDULO DE NEUROCIRUGÍA EN EL HOSPITAL DE
ESPECIALIDADES CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI

CIUDAD DE MÉXICO.

FEBRERO 2019.



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.

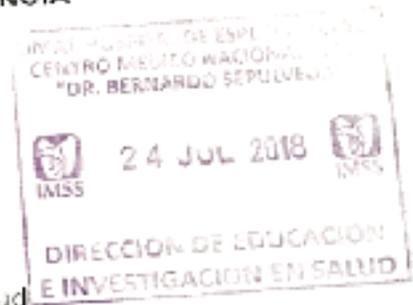
TITULO

"ANÁLISIS MOLECULAR E HISTOPATOLOGICO DEL LECHO QUIRÚRGICO EN
PACIENTES OPERADOS DE GLIOMAS DE ALTO GRADO DE MALIGNIDAD COMO
FACTORES PRONÓSTICOS DE RECURRENCIA"



Dra. Diana Menez Díaz

Jefa de la división de educación en salud
UMAE Hospital de Especialidades CMN SXXI



Dr. Gerardo Quinto Balanzar

Profesor titular del curso de Neurocirugía
UMAE Hospital de Especialidades CMN SXXI



Dra. Barbara Nettel Rueda

Asesor de Tesis
Medico Adscrito al Servicio de Neurocirugía
UMAE Hospital de Especialidades CMN SXXI

DEDICATORIAS

¿Qué sería la vida si no tuviéramos el valor de intentar cosas nuevas?

Para mis padres, Maricela y Odilón, por enseñarme que no hay algo imposible, por alentarme a volver realidad cada sueño, la habilidad es nada sin oportunidad, gracias a ustedes por brindarme la oportunidad de lograrlo.

Sería muy poco feliz, si pudiera decir hasta que punto lo soy, para Caro, que hace mi mundo mágico, por apoyar cada sueño, gracias por llenar mi vida de sorpresas inesperadas, de esas que se encuentran en una casa de té, eres mi historia bonita.

Hasta que extiendas tus alas, no tendrás idea de qué tan lejos puedes volar, gracias a mis hermanos, Toño, Omar y Cris, por siempre ser un ejemplo de honestidad, valor, y perseverancia.

El coraje no es tener la fuerza para seguir adelante, es seguir adelante cuando no tienes la fuerza, gracias a mi amigos Karina y Yair por mantenernos juntos en esto 5 años, y mantener esa actitud de siempre ser mejores.

Gracias a mis maestros de Neurocirugía, en especial a la Dra. Barbara Nettel, por enseñarme el arte de la Neurocirugía.

Si empiezas a conquistar Viena, conquista Viena...

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| 1. RESUMEN: | 6 |
| 2. MARCO TEORICO: | 8 |
| 2.1 CLASIFICACIÓN:..... | 8 |
| 2.2 TRATAMIENTO..... | 9 |
| 2.3 MARCADORES MOLECULARES | 11 |
| 2.4 EL NICHOS COMO UN OBJETIVO TERAPÉUTICO | 13 |
| 3. JUSTIFICACIÓN: | 15 |
| 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA: | 16 |
| 5. OBJETIVOS: | 16 |
| 5.1 GENERAL | 16 |
| 5.2 ESPECIFICOS | 16 |
| 6. HIPÓTESIS DE TRABAJO: | 17 |
| 7. MATERIAL Y MÉTODOS: | 17 |
| 7.1 DISEÑO Y TIPO DE ESTUDIO:..... | 17 |
| 7.2 POBLACIÓN DE OBJETIVO..... | 17 |
| 7.3 PERIODO:..... | 17 |
| 7.4 VARIABLES DEMOGRÁFICAS:..... | 17 |
| 7.5 VARIABLES CLÍNICAS: | 18 |
| 7.6 DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA | 21 |
| 7.6.1 INSTRUMENTO Y ESCALA DE MEDICIÓN DE LAS VARIABLES..... | 21 |
| 7.7 CRITERIOS DE INCLUSIÓN:..... | 21 |
| 7.8 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN..... | 22 |
| 7.9 CRITERIO DE ELIMINACIÓN | 22 |
| 7.10 TAMAÑO DE LA MUESTRA | 22 |
| 7.11 MUESTRA DE TEJIDO TUMORAL | 22 |
| 7.12 DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO | 23 |
| 7.13 IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES USANDO INMUNOHITOQUÍMICA. | 23 |
| 7.14 CUANTIFICACIÓN DE TRANSCRITOS POR RT-PCR TIEMPO REAL (RT-QPCR) ... | 24 |
| 7.15 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE MARCADORES MOLECULARES | 25 |
| 8. ASPECTOS ÉTICOS | 25 |
| 9. RECURSOS, FINANCIAMIENTO Y FACTIBILIDAD: | 26 |
| 9.1 RECURSOS FINANCIEROS | 26 |
| 9.2 FACTIBILIDAD | 26 |
| 11. RESULTADOS | 27 |
| 12. DISCUSIÓN | 34 |
| 13. CONCLUSIÓN | 37 |
| 14. ANEXO | 38 |
| 15. BIBLIOGRAFIA | 42 |

1. RESUMEN:

Introducción: El glioma es el tumor más común e intratable en el sistema nervioso central. El glioblastoma, que representa aproximadamente el 60-70% de los gliomas malignos, tiene el fenotipo biológico más agresivo. El perfil molecular ha proporcionado beneficio clínico para pacientes con varios cánceres avanzados, sin embargo, aparte de la metilación del promotor del gen de la enzima reparadora del DNA MGMT que predice la respuesta al tratamiento con Temozolomida (TMZ), los biomarcadores moleculares dentro del escenario clínico, no han probado ser útiles en el GBM. Durante la última década, el glioblastoma se ha caracterizado en varios subtipos de enfermedad mediante el uso de perfiles de expresión genética.

Objetivo: Evaluar la presencia de los marcadores moleculares FOXM1*3, VEGF, CD133, y A2B5 en el lecho quirúrgico de pacientes operados de glioblastoma y su relación como factores pronósticos de recurrencia.

Material y métodos: Se realizó un estudio de cohorte prospectivo, longitudinal, se incluyeron un total de 17 pacientes operados de gliomas de alto grado de malignidad en el servicio de Neurocirugía, un total de 19 muestras de aproximadamente 80 gr cada una, una vez terminando la resección tumoral completa macroscópicamente se tomaron muestras del lecho quirúrgico, se realizaron cortes histológicos y se analizaron marcadores moleculares CD133, A2B5, FOX1*3.

Resultados: total de 17 pacientes de quienes se obtuvieron un total de 19 muestras, ya que 2 pacientes se re-intervinieron por recidiva en menos de 3 meses, 10 hombres y 7 mujeres con edad media de 52.3 años, con localización predominante del tumor en el lóbulo frontal (9 muestras), estirpe astrocítica en el 73.7% (14 lesiones), grado IV en el 57.9% (11 muestras), con diagnóstico histopatológico positivo en el 52.6% y con marcadores moleculares positivos en 78.9%, se presentó recurrencia tumoral en 15 de los 19 tumores en un promedio de 13.33 meses, de los cuales 5 presentaron CD133 otorgando un RR de recurrencia de 1.091 (0.86-13.77, IC 95%), y A2B5 en 13 pacientes con un RR de recurrencia de 6.5 (0.55-76.17 IC 95%), FOX1*3 en 16 tumores con un RR de recurrencia de 4 (0.733-21.83 IC95%).

Conclusiones: A través de este estudio podemos concluir que detectar la presencia de marcadores tumorales nos ayuda a correlacionar con los tumores que presentaran recurrencia, En conjunto, estos resultados demuestran que los gliomas humanos contienen múltiples poblaciones de células con la capacidad de formar tumores, y la detección del marcador glial de superficie A2B5+ y CD133+ esta asociado con la recurrencia tumoral, por lo que dirigirse eficazmente a estos puede reducir eficazmente la invasión y recurrencia de los gliomas de alto grado.

| | |
|----------------------|--|
| 1. Datos del alumno | 1. Datos del alumno |
| Apellido paterno | García |
| Apellido materno | Nájera |
| Nombre | Alma Rosa |
| Teléfono | 5545407551 |
| Universidad | Universidad Nacional Autónoma de México |
| Facultad o escuela | Facultad de Medicina |
| Correo | alma.gn20@gmail.com |
| No. De cuenta | 513217100 |
| 2. Datos del asesor | 2. Datos del asesor (es) |
| Apellido paterno: | Nettel |
| Apellido materno: | Rueda |
| Nombre: | Barbara |
| 3. Datos de la tesis | 3. Datos de la tesis |
| Título | Análisis molecular e histopatológico del lecho quirúrgico en pacientes operados de gliomas de alto grado de malignidad como factores pronósticos de recurrencia. |
| Número de páginas | 44 |
| Año | 2019 |
| Numero de registro | R-2018-3601-150 |

2. MARCO TEORICO:

Los gliomas con los tumores primarios del Sistema Nervioso Central (SNC) más comunes hasta el momento, siguen siendo incurables.. El glioblastoma (GBM), que representa aproximadamente el 60-70% del glioma maligno, tiene el fenotipo biológicamente más agresivo de todos¹.

Los gliomas representan entre el 12% y el 15% de las neoplasias intracraneales y más del 60% de los tumores astrocíticos. Son tumores agresivos, clasificados según la OMS como grado IV. El pico de incidencia varia por edad entre los 40 y 70 años, la mayoría son tumores primarios (de novo) y menos del 10% emergen de un tumor de bajo grado de malignidad (secundario) ya existente y afectan con mayor frecuencia a pacientes menores a 45 años².

El glioblastoma es el más letal, incluso para los pacientes que reciben un tratamiento agresivo, la mediana de supervivencia es de 12 a 15 meses. Los tumores evolucionan rápidamente a medida que adquieren nuevas mutaciones; el aumento resultante en la heterogeneidad genómica intratumoral conduce al desarrollo de resistencia a los medicamentos, lo que limita la eficacia a largo plazo de las terapias³.

El glioblastoma es un tumor biológicamente agresivo que presentan desafíos de tratamiento únicos debido a las siguientes características: 1) localización del tumor en el cerebro; 2) resistencia intrínseca de estas lesiones al tratamiento convencional; 3) capacidad limitada del cerebro para repararse a sí mismo; 4) la diseminación de células malignas al parénquima cerebral; 5) la variable ruptura de la barrera hematoencefálica que complica la administración de medicamentos; 6) fuga capilar del tumor, con edema peritumoral resultante e hipertensión intracraneal; 7) la respuesta limitada a la terapia; y 8) la neurotoxicidad de los tratamientos dirigidos a los gliomas⁴.

2.1 CLASIFICACIÓN:

Los glioblastomas pueden surgir de novo como glioblastoma primario, o pueden desarrollarse a partir de astrocitomas de grado bajo o, más a menudo, de astrocitomas anaplásicos, en cuyo caso se denominan glioblastomas secundarios. Los glioblastomas primarios se presentan con mayor frecuencia en pacientes de mayor edad (edad media, 55 años), tienen una historia clínica corta y el gen supresor tumoral que está mutado con mayor frecuencia es el PTEN. Los glioblastomas secundarios a menudo se desarrollan a partir de astrocitomas de bajo grado durante meses o años; típicamente ocurren en pacientes más jóvenes (edad media <45 años) y tienen mutaciones en el gen supresor tumoral TP53 y del gen

que codifica la enzima isocitrato deshidrogenasa 1y 2 (IDH1/2). Los glioblastomas ocurren raramente en niños y adolescentes⁵.

De acuerdo a la actualización de la clasificación de los tumores primarios del SNC por la OMS realizada en 2016, Los glioblastomas se dividen en: glioblastomas IDH-tipo salvaje (no mutado) (aproximadamente 90% de los casos), que corresponde con mayor frecuencia al glioblastoma primario o de novo; glioblastoma IDH mutado (aproximadamente 10% de los casos), que corresponde al glioblastoma secundario; glioblastoma NOS, un diagnóstico que está reservado para aquellos tumores para los cuales no se puede realizar una evaluación completa del estado de IDH1/2. Se ha agregado una nueva variante provisional de glioblastoma: glioblastoma epitelioides. Se une al glioblastoma y al gliosarcoma de células gigantes bajo el paraguas del glioblastoma IDH tipo salvaje. Los glioblastomas epitelioides presentan grandes células epitelioides con abundante citoplasma eosinófilo, cromatina vesicular y nucléolos prominentes (a menudo semejantes a células de melanoma), y células rabdoideas de presentación variable. Los glioblastomas epitelioides con IDH tipo salvaje a menudo carecen de otras características moleculares de los glioblastomas IDH de tipo salvaje convencionales, como la amplificación del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) y pérdidas del cromosoma 10⁶.

2.2 TRATAMIENTO

El manejo de los gliomas de alto grado sigue siendo uno de los problemas más desafiantes en la neurocirugía. Los gliomas de alto grado son los tumores cerebrales primarios más frecuentes en pacientes adultos. Aunque los astrocitomas malignos primarios constituyen solo aproximadamente el 2% de todos los cánceres, se asocian con una discapacidad grave y una alta tasa de mortalidad. Los pacientes que albergan gliomas de alto grado a menudo se ven afectados en los años más productivos de sus vidas⁷. A pesar de las opciones adyuvantes disponibles para GBM, las tasas de supervivencia no han cambiado drásticamente, comparado con otros tipos de cáncer, como el cáncer de mama, de acuerdo con información de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC). Por lo tanto, la cirugía es una modalidad importante para establecer el diagnóstico (mediante confirmación histopatológica luego del exámen tisular) y mejorar el pronóstico manteniendo la actividad funcional del paciente previa a la intervención, ya que el grado de resección es el principal factor determinante para la supervivencia. La resección completa de gliomas de alto grado y gliomas de bajo grado aumenta la tasa de supervivencia media en 200% y 160% respectivamente, en

comparación con las tasas de supervivencia para pacientes sometidos a resección subtotal (STR). En un estudio de metanálisis sistemático retrospectivo realizado en más de 41,000 pacientes con GBM de reciente diagnóstico, se encontró que la resección macroscópicamente completa es superior a la resección subtotal con un incremento en la probabilidad de supervivencia a un año del 61% y una supervivencia libre de progresión tumoral a 12 meses en el 51% de los pacientes⁸.

La cirugía está indicada si la resección es factible con preservación funcional. Después de la cirugía de citorreducción, la supervivencia media después de la recurrencia varía de 8 a 12 meses para las glioblastomas y de 12 a 18 meses para los gliomas anaplásicos. A pesar de las controversias que rodean el beneficio o la ganancia de supervivencia debido a la alta morbimortalidad se recomienda la reoperación si las gliomas son resecables⁹.

Debido a la infiltración microscópica del tejido sano por células tumorales de los gliomas de alto grado de malignidad, la resección completa de estos tumores es prácticamente imposible, por lo que en la actualidad se considera que una resección igual o mayor al 90% del volumen tumoral sin comprometer las vías funcionales, es el objetivo realista deseado de cada neurocirujano. De hecho, incluso una resección subtotal del 70% del volumen tumoral, ha demostrado tener una mejoría estadísticamente significativa en la supervivencia global y el control de las convulsiones, en lesiones tumorales localizadas en áreas no elocuentes, una vez que se ha realizado la máxima resección posible, se puede evaluar realizar una resección supramarginal (TME), lo cual consiste en realizar la resección de unos milímetros extras del tejido sano que rodea el tumor, es decir, ir más allá del límite del tumor que se observa en los estudios de imagen ¹⁰.

El tratamiento estandar de GBM de reciente diagnóstico, es la máxima resección tumoral segura para el paciente, seguida de radioterapia local concomitante con temozolomida y, al término, por lo menos 6 ciclos de Temozolomida adyuvante, pero a pesar de la terapia estándar, el GBM tiene una alta tasa de recurrencia local (~ 90%) y con una menor respuesta a la terapia sucesiva. De acuerdo con las directrices de la OMS de 2007 para tumores cerebrales, los nuevos conocimientos sobre biología molecular y citogenética han permitido definir variantes emergentes de GBM¹¹.

La toma de decisiones quirúrgicas en pacientes con glioblastoma puede ser difícil y, en muchos casos, bastante subjetiva, lo que presumiblemente conduce a variaciones en la práctica. Se pueden tener en cuenta numerosos factores, como la ubicación del tumor, el nivel funcional de los pacientes, la comorbilidad, la edad y la EOR esperada. En la práctica clínica,

algunos abogan por la resección primaria en casi todos los pacientes, mientras que otros recomiendan la resección sólo cuando la resección total o la resección por encima de uno de los niveles umbrales publicados parezcan realistas. Sin embargo, la ganancia en la supervivencia potencial de una Extensión de la resección del 90% del volumen tumoral en un tumor de 150 ml es presumiblemente diferente que de la misma Extensión de la resección en un tumor de 20 ml. Se ha reportado en la literatura que el VTR está más estrechamente relacionado con la supervivencia que la extensión de la resección y está documentado que el beneficio en la supervivencia es estadísticamente significativo para VTR igual o menor que 2 ml en el glioblastoma¹².

2.3 MARCADORES MOLECULARES

Los recientes avances en las técnicas de diagnóstico molecular proporcionan herramientas adicionales para la subclasificación con distinta correlación biológica y clínica. La mayoría de los marcadores moleculares para gliomas en adultos se estudian mejor en tumores de alto grado, especialmente glioblastoma, el subtipo más común y más agresivo¹³.

Se ha demostrado que las mutaciones importantes para la clasificación de estos tumores son importantes en génesis del glioma. Algunos genes críticos para la comprensión de la tumorigénesis y el pronóstico de GBM incluyen O-6-metilguanina-ADN-metiltransferasa (MGMT), isocitrato deshidrogenasa gen 1 y 2 (IDH1 / 2), p53, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN), fosfoinositida 3-quinasa (PI3K) y deleciones en los cromosomas 1 (brazo corto) y 19 (brazo largo). Estos genes sirven como biomarcadores de la agresividad de la enfermedad, proporcionan información sobre la fisiopatología de la enfermedad y pueden servir como sitios potenciales para el tratamiento específico¹⁰.

El perfil molecular ha proporcionado beneficio clínico para pacientes con varios cánceres avanzados, sin embargo, aparte de la metilación del promotor del gen que codifica la enzima reparadora del DNA MGMT que predice la respuesta al tratamiento con Temozolomida (TMZ), los biomarcadores moleculares dentro del escenario clínico, no han probado ser útiles en el GBM. Durante la última década, el glioblastoma se ha caracterizado en varios subtipos de enfermedad mediante el uso de perfiles de expresión génica. La aplicación reciente de estrategias de secuenciación integrada ha proporcionado una comprensión más amplia del paisaje genómico y las clasificaciones moleculares de GBM. El análisis de secuenciación de GBM condujo a la identificación de mutaciones en los genes de isocitrato deshidrogenasa 1 o 2

(IDH1, IDH2), típicamente se encuentran en pacientes más jóvenes y se ha demostrado que confieren de manera independiente un mejor pronóstico. Estos casos son probablemente glioblastomas secundarios, que surgen con el tiempo a partir de un astrocitoma de grado inferior. El análisis del Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA) de glioblastomas primarios confirmó los hallazgos anteriores, subclasificando el glioblastoma en al menos 4 subtipos utilizando un análisis basado en la expresión. El subtipo proneural muestra mejor supervivencia y a menudo alberga mutaciones de IDH y otras anomalías de metilación. Otros 3 subtipos (mesenquimal, clásico y neuronal) se segregan de acuerdo con distintos patrones de expresión génica, pero hay poca o ninguna diferencia de supervivencia entre ellos. Se han completado perfiles más extensos que incluyen perfiles de metilación, que pueden prestarse a mejores factores de estratificación e identificar anomalías genéticas adicionales y alteraciones de las vías¹⁴.

El glioblastoma exhibe una sorprendente heterogeneidad celular y molecular no solo a través sino también dentro de los glioblastomas. De hecho, un paciente con glioblastoma probablemente alberga varias enfermedades diferentes dentro del mismo tumor, de modo que cada tumor es en realidad una constelación compleja y dinámica de cambios celulares y moleculares que contribuyen a la patobiología de la enfermedad¹⁵.

Los biomarcadores moleculares mejor estudiados en los GBMs con implicaciones en pronóstico son la metilación del promotor de la enzima MGMT y el estado de mutación de la enzima IDH1. Respecto al promotor de la enzima MGMT, hay que decir que entre el 30% y el 40% de los GBMs primarios lo expresan positivamente. Recientes estudios han mostrado que el estado de metilación del promotor no depende de la edad y en la población anciana se reporta como un marcador de pronóstico positivo para la supervivencia total y sirve para predecir la respuesta a los tratamientos con temozolamida. Los GBMs secundarios, cuya incidencia en la población disminuye con la edad, tienen la mejor supervivencia total independiente de los esquemas de tratamiento, expresan más la mutación IDH1 comparados con los GBMs primarios y en la población anciana es infrecuente encontrar una expresión positiva para esta enzima (< 2%)¹⁶.

El CD133 es el biomarcador mejor estudiado y se usa a menudo experimentalmente para identificar y las células que ayudan a que inicien y propaguen los tumores, se expresa durante el desarrollo embrionario¹⁷.

Otras alteraciones genéticas valoradas, tales como la mutación TP53 y la amplificación en el receptor Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) tienen un pésimo pronóstico. Estos

cuatro biomarcadores no se han validado en estudios prospectivos⁶ y no tienen influencia en decisiones clínicas, excepto la MGMT por su asociación con mejores respuestas a los tratamientos con temozolamida¹⁶.

Las imágenes por resonancia magnética (MRI) del glioblastoma generalmente muestran diferentes componentes: la región que mejora el contraste, que representa la parte más maligna con una fuga de la barrera hematoencefálica; áreas necróticas, típicamente localizadas dentro del tumor potenciador del contraste; tumor que no mejora; y la región edematosa que rodea el tumor. Se ha demostrado previamente que el volumen de tumor que mejora el contraste y la participación del cerebro elocuente son factores pronósticos negativos independientes en pacientes con glioblastoma¹⁸.

A pesar de la mejoría en la resección quirúrgica, la radioterapia adyuvante y la quimioterapia con temozolomida (TMZ), los pacientes con glioblastoma obtienen pocos beneficios del tratamiento estándar actual. La mediana del tiempo de supervivencia de los pacientes con glioblastoma es de solo 12-15 meses y la tasa de supervivencia a 5 años fue solo del 4,7%. Se han realizado esfuerzos sustanciales en la identificación de marcadores moleculares específicos y dianas terapéuticas para mejorar el resultado de los pacientes con pronóstico. Recientemente, la red de investigación The Cancer Genome Atlas (TCGA) identificaron tres vías de señalización principales subyacentes a la patogénesis del glioblastoma: vías de señalización del receptor tirosina quinasa (RTK) / RAS / fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), p53 y la proteína del retinoblastoma (RB). Varios agentes terapéuticos contra objetivos implicados en estas vías se han investigado exhaustivamente en ensayos clínicos actuales para tratar pacientes con glioblastoma. Sin embargo, varios enfoques terapéuticos únicos o combinados dirigidos a estos efectores todavía no lograron mejorar la supervivencia general (SG). Por lo tanto, el descubrimiento de nuevos objetivos terapéuticos y moleculares relacionados con el pronóstico tiene una gran importancia clínica¹.

2.4 EL NICHOS COMO UN OBJETIVO TERAPÉUTICO

Las células madre de varios tumores cerebrales, incluido el glioblastoma, se mantienen en nichos vasculares que imitan el nicho de las células madre neurales. La noción de que las células madre del cáncer existen en nichos de células madre aberrantes es muy atractiva. Es ciertamente plausible que las similitudes entre las células madre normales y las células madre cancerígenas podrían extenderse a la relación única que las células madre tienen con sus microambientes inmediatos. De hecho, la evidencia de que los nichos de células madre

anormales contribuyen al desarrollo de la enfermedad mieloproliferativa³⁸ sugiere que este fenómeno podría operar en diversos trastornos neoplásicos. Además de regular la proliferación de células madre y las decisiones de destino de las células, los nichos también tienen un papel protector, protegiendo a las células madre de los insultos ambientales. Por lo tanto, las células madre de glioblastoma que son inherentemente resistentes a la radiación¹³ podrían estar protegidas más allá de las terapias convencionales por factores dentro del nicho vascular, permitiendo a estas células reformar una masa tumoral después de una respuesta clínica inicial. Los tratamientos que interrumpen los aberrantes nichos de células madre vasculares podrían, por lo tanto, resultar activos contra el glioblastoma. Los ensayos clínicos de los fármacos antiangiogénicos bevacizumab y cediranib (AZD2171) han demostrado una eficacia alentadora en pacientes con glioblastoma. Este efecto antitumoral podría ser el resultado de la "normalización" de la vasculatura tumoral o del agotamiento del suministro sanguíneo tumoral, que son mecanismos de acción propuestos de fármacos antiangiogénicos. Sin embargo, la presencia de un nicho de células madre de glioblastoma implicaría que estos fármacos también podrían funcionar para interrumpir el mantenimiento de células madre¹⁹.

3. JUSTIFICACIÓN:

En el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS en el periodo 2005 – 2011 se atendieron a 1,257 pacientes con tumores intracraneales, de los cuales 41.3% tuvieron diagnóstico de glioma y entre ellos, el glioblastoma predominó con un 46.8% [Fuente directa].

De manera particular, cuando la localización permite una resección tumoral mayor al 90% es posible incrementar la sobrevida del paciente más de un año, por ello es importante conocer y emplear nuevas tecnologías que ayuden a verificar la presencia de tumor residual²⁰.

El glioblastoma es el tumor intraxial del SNC mas frecuente y letal. Actualmente a pesar de que varios agentes terapéuticos contra objetivos implicados en las vías de señalización mas estudiadas se han investigado exhaustivamente en ensayos clínicos para tratar pacientes con glioblastoma, aun no se han logrado mejorar la supervivencia general de esta patología. Ante esto es necesario el estudio y descubrimiento de nuevos marcadores moleculares relacionados con el pronóstico de esta entidad que potencialmente tengan impacto en el tratamiento y pronostico de esta entidad¹.

La formación excesiva y extremadamente desorganizada de vasos sanguíneos es un sello distintivo del glioblastoma. Se supuso que esta aberrante vascularidad era importante para satisfacer las demandas voraces de nutrientes de el tumor de crecimiento rápido. Sin embargo, la existencia de células madre de glioblastoma y el descubrimiento de nichos de células madre vasculares en el cerebro normal sugieren un papel siniestro adicional para el lecho vascular tumoral: la formación de nichos de células madre anormales que mantienen las células madre cancerosas ¹⁹.

La información que se pueda proporcionar al respecto permitirá un tratamiento postquirúrgico localizado.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

Este trabajo propone la evaluación en el lecho quirúrgico tanto de marcadores moleculares como el análisis histopatológico para confirmar la presencia o ausencia de tumor residual y analizar la relación de estos resultados con la recurrencia del tumor .

5. OBJETIVOS:

5.1 GENERAL

Evaluar la presencia de los marcadores moleculares VEGF, FOXM1*3, CD-133, y A2B5 así como el diagnóstico histopatológico en el lecho quirúrgico de pacientes operados de gliomas de alto grado de malignidad, y su relación como factores pronósticos de recurrencia.

5.2 ESPECIFICOS

- a) Determinar la presencia de las proteínas VEGF, FOXM1*3, CD-133, y A2B5 en muestras de tejido proveniente de el lecho quirúrgico al término de la resección tumoral de pacientes operados de gliomas de alto grado de malignidad.

- b) Identificar la presencia de células tumorales por medio de estudios histopatológicos y correlacionar con la detección marcadores tumorales en muestras del lecho quirúrgico de pacientes operados de gliomas de alto grado de malignidad.

- c) Correlacionar la presencia o ausencia de los marcadores moleculares VEGF, FOXM1*3, CD-133, y A2B5 así como el diagnóstico histopatológico en el tejido del lecho quirúrgico con la recurrencia de la enfermedad.

6. HIPÓTESIS DE TRABAJO:

Es posible detectar células tumorales en el lecho quirúrgico de gliomas de alto grado de malignidad las cuales permitan evaluar la presencia de marcadores moleculares que se asocien con la recurrencia de la enfermedad en un tiempo más corto.

7. MATERIAL Y MÉTODOS:

7.1 DISEÑO Y TIPO DE ESTUDIO:

Estudio de cohorte prospectivo, longitudinal de pacientes con gliomas de alto grado de malignidad.

7.2 POBLACIÓN DE OBJETIVO

Pacientes con diagnóstico de gliomas de alto grado de malignidad operados en el Hospital de Especialidades de CMN Siglo XXI a los que se les haya realizado resección del tumor macroscópicamente completa.

7.3 PERIODO:

Pacientes operados entre Enero 2014 - Enero 2018

7.4 VARIABLES DEMOGRÁFICAS:

| Nombre de la variable | Definición conceptual | Definición operacional |
|-----------------------|--|--------------------------------|
| Sexo | Conciencia de pertenecer a un sexo u otro, es decir, varón o mujer. | Con base a la historia clínica |
| Edad | Tiempo transcurrido a partir del nacimiento del individuo a la actualidad. | Con base a la historia clínica |

7.5 VARIABLES CLÍNICAS:

| Nombre de la variable | Definición conceptual | Definición operacional |
|--------------------------|---|---|
| Estudio histopatológico | Es el estudio del sufrimiento o daño de las células que se observan en un tejido. | De acuerdo a la interpretación del neuropatólogo. |
| Localización del glioma. | Es la zona anatómica que abarca el glioma en el cerebro. | De acuerdo con los estudios de imagen y síntomas clínicos. |
| Grado de resección | Es el volumen que puede ser resecado por el neurocirujano sin afectar áreas eloquentes. No podemos evaluar el volumen porque no lo vamos a medir. Se hará solamente la correlación con el estudio de imagen potquirúrgico en el que se va a determinar únicamente si hay o no hay tumor residual. | De acuerdo con el tamaño y localización del glioma, la experiencia del neurocirujano y tecnología que cuente el hospital. |

| Nombre de la variable | Definición conceptual | Definición operacional | Definición metodológica |
|------------------------|---|---|--------------------------|
| <i>Glioma grado IV</i> | Tumor difusamente infiltrante y pobremente diferenciado de las células gliales, suele originarse en la sustancia blanca y la denominación multiforme está dada por la heterogeneidad que se identifica a nivel microscópico. El más común es el GBM multiforme. | <u>Histopatológicamente. GBM con componente Astrocítico o Oligodendrocítico:</u> Actividad mitótica. Mayor densidad celular y más núcleos pleomórficos que un grado III. Proliferación microvascular y/o necrosis. | Independiente y discreta |

| | | | |
|-------------------------|--|---|--------------------------|
| <i>Glioma grado III</i> | Tumor de forma neoplásica de alta malignidad, infiltrantes y con posibilidad de metastizar. El más común es el Astrocitoma anaplásico. | <u>Histopatológicamente.</u> Astrocitoma: Actividad mitótica. Mayor densidad celular y más núcleos pleomórficos que un grado II. Mayor número de astrocitomas gemistocíticos que el grado II. Proliferación vascular y necrosis. Oligodendroglioma: Se observan los componentes de un tumor neoplásico pero sobresale la estirpe celular oligodendrócítica. Glioma mixto: Se observan las características neoplásicas con más de una estirpe celular. | Independiente y discreta |
| <i>Tumor</i> | Masa tumoral detectada en el paciente al momento que ingresa al Servicio de Neurocirugía. | A partir de la TAC con contraste es posible obtener cortes axiales, se seleccionará los de mayor dimensiones. | Independiente y continua |
| <i>A2B5</i> | Marcador de células madre neurales. Es un gangliosido de superficie celular que se expresa en células precursoras neurales en el cerebro adulto y en las células madre de la zona subventricular embrionaria. | Inmunohistoquímica: Identificación por anticuerpos específicos. | Dependiente y continua |
| <i>CD-133</i> | Marcador de células madre neurales. Se encuentra en las células madre neurales del cerebro fetal y ependimales del cerebro adulto. Permite aislar poblaciones de células madre de diferentes tipos de cáncer. La sobre-expresión de la proteína se asocia con la recidiva del tumor. | Inmunohistoquímica y RT + qPCR | Dependiente y continua |

FOXM1

Marcador de malignidad. Es un factor de transcripción involucrado en el ciclo celular y organogénesis. Se presenta en tejidos fetales o con alto recambio celular. La isoforma C se expresa en tumores y se considera la más representativa porque no hay expresión en cerebro sano.

RT + qPCR: Extracción de RNA total, síntesis de cDNA e identificación por primers específicos.

Dependiente y continua

VEGF

Marcador de angiogénesis. Es una proteína que induce la vascularización *de novo* (angiogénesis). Se relaciona con la formación de edema.

Dependiente y continua

7.6 DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA

7.6.1 INSTRUMENTO Y ESCALA DE MEDICIÓN DE LAS VARIABLES

| Nombre de la variable | Instrumento de medición o técnica de laboratorio | Escala de medición |
|-------------------------|--|--|
| Glioma grado III ó IV | Histología convencional | Análisis microscópico de variable ordinal con 4 categorías. Se aplicará formato del Anexo I |
| Tumor Tumor residual | RM TAC de contraste | Se obtendrá el volumen por medición directa: Altura X Ancho X Profundidad X Factor 1.15 |
| GFAP A2B5 | Inmunohistoquímica, | Cuantificación densitométrica de variable continua que se obtiene de combinar el área y la intensidad. En pixeles. |
| CD-133 | Inmunohistoquímica + PCR-tiempo real | Cuantificación densitométrica y detección de fluorescencia |
| FOXM1 VEGF | PCR-tiempo real | Cuantificación por detección de fluorescencia. Los valores se interpolan en una curva, se normalizan y se reportan como veces con respecto a un control. |

7.7 CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- 1) Todos los pacientes mayores de 16 años que fueron sometidos a resección de gliomas de alto grado de malignidad en los que se haya logrado una resección macroscópicamente completa

- 2) Pacientes que acepten ingresar al proyecto después de la firma de la carta de consentimiento informado.

7.8 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- 1) Pacientes externos al Instituto Mexicano del Seguro Social
- 2) Pacientes menores de 16 años
- 3) Pacientes con cirugía previa de gliomas de alto grado de malignidad realizada en otra institución médica.
- 4) Pacientes mujeres embarazadas
- 5) Todos aquellos pacientes que se nieguen a formar parte del protocolo y firmar el consentimiento informado.

7.9 CRITERIO DE ELIMINACIÓN

- 1) Pacientes sin expediente clínico
- 2) Pacientes que soliciten salir del protocolo
- 3) Pacientes con diagnóstico histopatológico definitivo diferente a gliomas de alto grado de malignidad.
- 4) Pacientes que fallezcan por una causa distinta a la enfermedad
- 5) Pacientes que pierdan su seguro social y por lo tanto dejen de acudir a su consulta

7.10 TAMAÑO DE LA MUESTRA

Se incluyeron todos los pacientes operados de gliomas de alto grado de malignidad en el servicio de Neurocirugía del Centro Médico Nacional Siglo XXI entre el enero 2014 y Enero 2018 que cumplieron con los criterios señalados.

7.11 MUESTRA DE TEJIDO TUMORAL

Se obtuvieron muestras de aproximadamente 80 mg del lecho quirúrgico de pacientes que aceptaron ingresar al protocolo, con diagnóstico de glioma de alto grado de la siguiente forma:

- 1) Se identificó el tumor y se tomó una muestra de tejido tumoral evitando áreas elocuentes

Una vez terminada la resección tumoral se tomaron muestras aleatorias del lecho quirúrgico, identificando las muestras de acuerdo a su localización anatómica.

- 2) Se tomaron muestras del lecho quirúrgico, tomando de la misma área una muestra para fijación con paraformaldehído al 4% + 0.2 de glutaraldehído en amortiguador de fosfato, para diagnóstico histopatológico y la otra muestra se congelará con nitrógeno líquido, para marcadores moleculares.

7.12 DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO

Las muestras de tejido se fijaron con paraformaldehído al 4% + 0.2 de glutaraldehído y fueron embebidas en parafina, se realizaron cortes histológicos sobre laminillas con poli-L-lisina para ser teñidas con hematoxilina y eosina. Estos cortes fueron analizados por el neuropatólogo para determinar la estirpe celular, y viabilidad para realizar la técnica por inmunohistoquímica.

7.13 IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES USANDO INMUNOHITOQUÍMICA.

Un fragmento de tejido, fue colocado en el fijador paraformaldehído al 4% + 0.2 de glutaraldehído en amortiguador de fosfato (220mosm) y se dejó 72 horas en el fijador a 4°C. Se procesaron para ser incluido en parafina, después se obtuvieron cortes en microtomo de tejido cerebral de 12 micras de espesor los cuales fueron montados en laminillas con adhesivo poli-lisina (sigma). Los cortes fueron almacenados en cajas de plástico hasta su procesamiento.

Los cortes se deparafinaron a 60°C por 30 minutos y se hidrataron en alcoholes decrecientes hasta llegar a alcohol al 70%, se enjuagaron en agua destilada y se colocaron en amortiguador de citratos pH 6.0, 0.12 M, por 15 minutos en una olla de presión, se dejan 20 minutos en agitación, seguido de eso se enjuagarán con PBS-tritón (1%) y se inhibió la peroxidasa endógena con peróxido al 0.5% por 10 minutos, se enjuago con PBS-T, enseguida se incubaron los tejidos en cámara húmeda con suero normal bovino por 2 horas, se escurrió el exceso y se colocó el anticuerpo CD-133, o A2B5 diluidos en PBS-SNH (1%) –tritón (0.1%) en una dilución 1:150 , cada anticuerpo, se incubó por 24 horas. Seguido de esto los tejidos se lavaron con PBS-Tritón tres veces por diez minutos y se incubaron con el 2do anticuerpo marcado con Biotina contra la especie del primario a una dilución 1:200 durante 2 horas

(dilución en PBS- Tritón). A continuación se lavo con PBS-Tritón tres veces por diez minutos. Se hizo una segunda incubación con streptavidina, por 2 horas se lavaron con PBS-tritón tres veces y finalmente una con agua destilada. Se revelaron con 3'3'.diaminobenzidina más H₂O₂ (12 ul) se enjuagaron por 5 minutos, se contrastaron con hematoxilina de Harris, se deshidrataron y se montaron con Entellan (Merck) se dejaron secar 1 día. Las laminillas fueron evaluadas por el neuropatólogo experto en el área para determinar la extirpe celular y grado de malignidad.

7.14 CUANTIFICACIÓN DE TRANSCRITOS POR RT-PCR TIEMPO REAL (RT-QPCR)

Extracción de RNA total por los sistemas RNeasy Plus Micro o RNeasy Plus Mini (QIAGEN, Alemania): 10-30 mg de tejido tumoral, se agregará de 350-600µl de amortiguador *RLT Plus+* β-ME (1ml:10µl) y se homogenizará en columnas *QIAshredder* por centrifugación, 2 min a velocidad máxima. El eluido del homogenado se transfiere a la columna *gDNA Eliminator*, se centrifuga 8,000xg por 30 seg, al eluido de la columna se le agrega 1 vol de etanol al 70%, se mezcla se transfiere a la columna *RNeasy*, se centrifuga 8,000xg por 30 seg. La columna se lava con 700µl de amortiguador *RW1* y 2 veces con 500µl de amortiguador *RPE* + etanol, en cada lavado se centrifuga 8,000xg por 30 seg. Por último, la columna de seca por centrifugación y se hidrata con 15-40 µl agua grado biología molecular durante 15 min a 4°C. El RNA total se recupera por centrifugación a 8,000xg por 1 min, se guarda a -80°C y se medirá al día siguiente concentración del ARN total por espectrofotometría a 260 nm y la pureza por el índice de 260/280 nm.

Síntesis de cDNA: 0.5-1µg de RNA total diluidos en 6µl de agua, 1µl de hexámeros (random primers, Fermentas, USA) y 1µl de deoxinucleótidos (dNTP's, Fermentas, USA) serán incubados a 65°C por 5 min, posteriormente se añadirán 1 µl del amortiguador de reacción 10x y 1µl de su enzima RT-MMLV (transcriptasa reversa, Fermentas, USA). La reacción se lleva a un termociclador (Bio-Rad, USA) utilizando el siguiente programa: 10 min a 25°C un ciclo, 50 min a 37°C un ciclo y 15 min a 70 min un ciclo. La calidad de la muestra se comprobará por la amplificación del gen IPO8.

Amplificación de genes: 250ng de cDNA o 1.5fg – 3pg de gBlocks IDT, 1 µl de reactivo LightCycler Taqman Master (Roche, EUA), 1 µl primers + sondas IDT ZEN para los genes CD-133 y CD-15 se llevan a un volumen de 10 ul de reacción en capilares. La reacción se realizará en el termociclador LightCycler 2.0 con el programa recomendado: peincubación 10 min a 95°C; amplificación 20 seg a 95°C, 10 seg a 51-57°C (según el gen), 1 seg a 72°C por 40

ciclos; enfriamiento 30 seg a 40°C. Los valores serán normalizados con el gen control IPO8. Los valores de la curva serán graficados y se obtendrá la ecuación de linealidad para la interpolación de los valores de las muestras. Se considero como ausencia del marcador a los valores iguales o menores a los obtenidos con el control negativo (agua).

7.15 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE MARCADORES MOLECULARES

Los valores de los marcadores moleculares obtenidos por inmunohistoquímica y PCR-tiempo real se identificaron según el lecho quirúrgico con o sin evidencia de tumor residual. Por último, los resultados se analizaron por la prueba ANOVA no paramétrica (Kruskal Wallis) y con el programa de cómputo Microsoft y PSPP, se realizaron gráficas de frecuencias, así como de productos cruzados.

8. ASPECTOS ÉTICOS

RIESGOS DE LA INVESTIGACIÓN: Esta investigación se considera sin riesgo de acuerdo a la Ley General de Salud contenida en la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos en materia de Investigación para la salud en seres humanos, título segundo, capítulo I, artículo 17, publicada en el Diario Oficial de la Federación el día 6 de enero de 1987. Es sin riesgo ya que sólo se va tomar información de expedientes

APEGO A NORMATIVAS Y TRATADOS. El presente proyecto se ajusta a los preceptos enunciados en la declaración de Helsinki y sus revisiones así como a lo estipulado en la Ley General de Salud en cuanto a la investigación médica en sujetos humanos. Consentimiento informado. Se obtuvo consentimiento para uso de la información en el contexto del protocolo: Asociación de los marcadores moleculares con el grado de malignidad, supervivencia, calidad de vida y cognición en pacientes con glioma cerebral. Potenciales beneficios. Los pacientes no tienen beneficio directo.

POTENCIALES RIESGOS. No hay riesgos añadidos al paciente porque solo se obtiene información de expedientes.

CONFIDENCIALIDAD DE LA INFORMACIÓN: La base de datos está codificada y la información solo es accesible a los investigadores con lo cual se garantiza la confidencialidad de la información.

Selección de los potenciales participantes. Se incluyeron todos los pacientes con las características necesarias para el estudio, no se discriminó a nadie.

9. RECURSOS, FINANCIAMIENTO Y FACTIBILIDAD:

9.1 RECURSOS FINANCIEROS

Recursos Humanos: Residente, tutora y asesores.

Recursos Materiales: Expedientes clínicos, laboratorio de inmunohistoquímica, sistema de imágenes.

9.2 FACTIBILIDAD

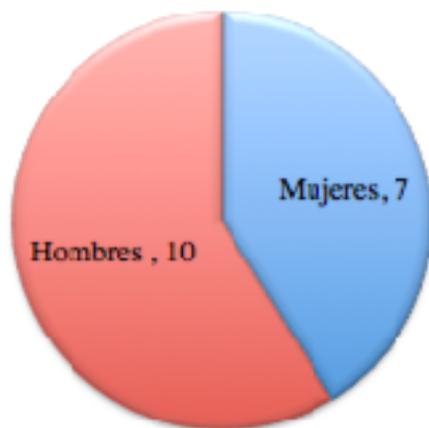
La investigación fue factible ya que la recolección de pacientes se hizo en el servicio de Neurocirugía del Hospital de Especialidades de CMN SXXI, La infraestructura, equipo y personal con los que cuenta el laboratorio de neuromorfología y biología molecular ubicados en planta baja del Hospital de Especialidades “Dr. Bernardo Sepúlveda Gutiérrez”, Centro Médico Nacional “Siglo XXI” fueron suficientes para realizar las técnicas de inmunohistoquímica y RT-PCR tiempo real, los estudios de imagen se realizaron en el mismo Hospital y el resto de los recursos materiales se llevaron a cabo por parte del investigador.

El presente estudio concluyo con resultados favorables ya que se contó con la experiencia en el manejo de pacientes y el reconocimiento de las metodologías.

11. RESULTADOS

En el estudio se incluyeron un total de 17 pacientes durante el periodo comprendido de enero 2014 a enero 2018, los cuales fueron sometidos a resección tumoral con diagnóstico de glioma de alto grado, quienes no habían presentado alguna otro tratamiento, se obtuvieron muestras del lecho quirúrgico una vez que se observó microscópicamente resección completa del tumor, un total de 19 muestras ya que de los 17 pacientes, 2 fueron sometidos a reintervención quirúrgica por presentar recidiva tumoral antes de los 6 meses, el seguimiento fue de 4 a 43 meses hasta el momento de corte del estudio.

La población estudiada se constituyó por pacientes del género masculino en el 58% de los casos (10 pacientes) y género femenino en el 42% de los casos (7 mujeres) (Gráfica 1). En los resultados descriptivos cuantitativos la media de edad fue de 52.3 años con un rango mínimo de 23 años y máximo de 79 años.

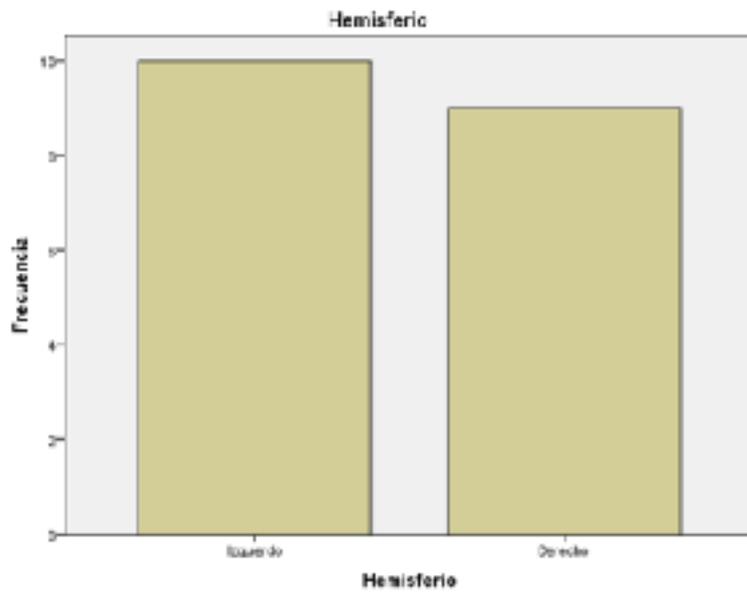


Gráfica. 1
Proporción de género de pacientes operados

La localización tumoral, de acuerdo a la frecuencia fue de 9 pacientes con la lesión en el lóbulo frontal, 4 en el lóbulo parietal, 3 en el lóbulo temporal, 3 pacientes en los que la lesión invadía más de un lóbulo, 2 frontoparietal y 1 temporoparietal (Tabla 1), según el hemisferio en el cual se localizaba, se encontró un predominio discretamente mayor en el hemisferio izquierdo 10 lesiones y en el derecho 9 lesiones (gráfica 2).

Tabla 1. Localización tumoral por lóbulo cerebral

| Localización | Lóbulo | Frecuencia | Porcentaje |
|-------------------|---------|------------|------------|
| | Frontal | 9 | 47.4 |
| Temporal | 3 | 15.8 | |
| Parietal | 4 | 21.1 | |
| Temporal-parietal | 1 | 5.3 | |
| Frontal-parietal | 2 | 10.5 | |
| Total | 19 | 100.0 | |



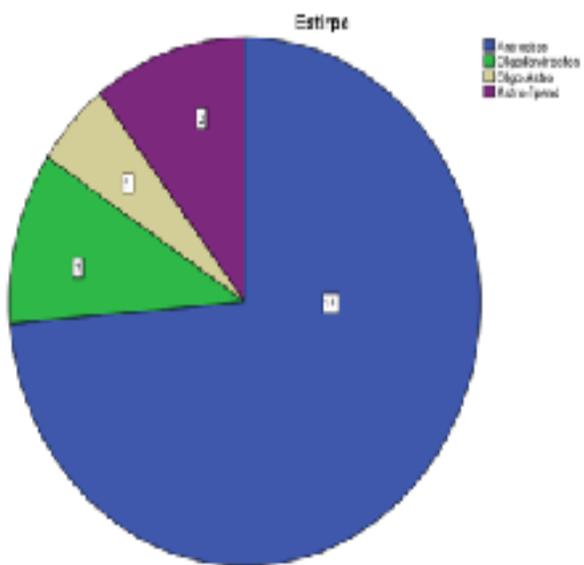
Gráfica 3. Localización tumoral según el hemisferio cerebral

Según el grado de malignidad del tumor, el glioblastoma (grado IV) fue el que se presento con mayor frecuencia, con un porcentaje del 57.9% (11 tumores), grado II 21.1% (4 pacientes), grado III 15.8% (3 pacientes) y solo 5.3% como grado I (1 paciente) (Tabla 2).

Tabla 2. Grado de malignidad tumoral

| Grado | Frecuencia | % | % Valido |
|-------|------------|-------|----------|
| I | 1 | 5.3 | 5.3 |
| II | 4 | 21.1 | 21.1 |
| III | 3 | 15.8 | 15.8 |
| IV | 11 | 57.9 | 57.9 |
| Total | 19 | 100.0 | 100.0 |

De acuerdo con la estirpe celular, un porcentaje de 73.7% (14 lesiones) pertenecían a tumores derivados de los astrocitos, 10.5% (2 lesiones) a oligodendrocitos, y 3 tumores mixtos, 2 astrocitos y células ependimarias y 1 astrocitos y oligodendrocitos.



En cuanto al diagnóstico histopatológico del lecho quirúrgico, el 52.6% de las muestras presentaron un diagnóstico negativo (10 muestras) y el 47.4% (9 muestras) se encontraron positivas al diagnóstico histopatológico (Tabla 3).

Tabla 3. Diagnóstico histológico de células tumorales

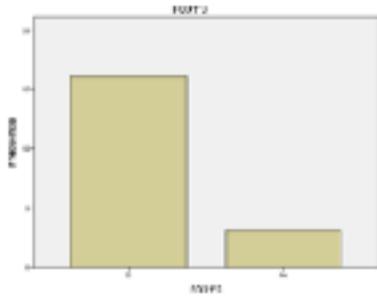
| Diagnóstico | Frecuencia | Porcentaje | Porcentaje Válido | Porcentaje acumulado |
|-------------|------------|------------|-------------------|----------------------|
| Si | 9 | 47.4 | 47.4 | 47.4 |
| No | 10 | 52.6 | 52.6 | 100.0 |
| Total | 19 | 100.0 | 100.0 | |

En cuanto a la expresión de marcadores tumorales en el lecho quirúrgico se encontraron sobre expresados en un porcentaje de 78.9% (15 pacientes) y en el 21.1% (4 pacientes) no (tabla 4).

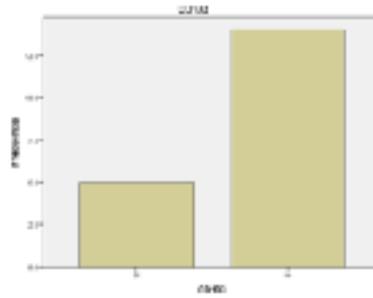
Tabla 4. Marcadores con sobre expresión positiva en lecho quirúrgico

| Diagnóstico | Frecuencia | Porcentaje | Porcentaje Válido | Porcentaje acumulado |
|-------------|------------|------------|-------------------|----------------------|
| Positivo | 15 | 78.9 | 78.9 | 78.9 |
| Negativo | 4 | 21.1 | 21.1 | 100.0 |
| Total | 19 | 100.0 | 100.0 | |

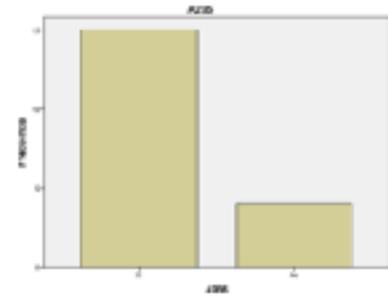
Referente a la expresión positiva de FOX1*3, se encontró sobre expresión en 16 lesiones, tomando como rango 0.04 ± 0.02 , no se encontró sobre expresado en 3 lesiones, VEGF se encontró positivo en las 19 lesiones, mientras que CD-133 con un rango de 0.40 ± 0.27 se encontró sobre expresado en 5 lesiones, 3 de las cuales correspondan a Glioblastomas, y no se presento sobre expresado en 14 lesiones, así también A2B5 se presento sobre expresado en 15 lesiones y solo en 4 no se presento sobre expresión (Gráficas 5,6 y 7).



Gráfica 5. Sobre expresión positiva de FOX1*3



Gráfica 6. Sobre expresión positiva de CD-133



Gráfica 7. Sobre expresión positiva de A2B5

Si comparamos el diagnóstico histopatológico con el diagnóstico de marcadores tumorales observamos que de las 15 muestras que presentaron marcadores moleculares positivos, solo 8 fueron diagnosticadas por histopatología con presencia de tumor, sin embargo de las 9 muestras identificadas con tumor por histopatología, solo en 1 no se encontró sobre expresión tumoral, debido a que los marcadores moleculares se encontraban en rangos normales, sin embargo el paciente hasta el momento del corte aun no presentaba recidiva tumoral después de 43 meses de seguimiento (Tabla 5).

Tabla 5. Comparación entre diagnóstico molecular e histopatológico

| Recuento | | Tumor histológico | | Total |
|-------------------|----|-------------------|----|-------|
| | | Si | No | |
| Marcador en lecho | Si | 8 | 7 | 15 |
| | No | 1 | 3 | 4 |
| Total | | 9 | 10 | 19 |

En cuanto a la relación entre los pacientes que presentaron diagnóstico molecular positivo y los que presentaron recurrencia tumoral encontramos de los 15 tumores con marcadores tumorales positivos, presentaron recurrencia tumoral en algún punto del seguimiento, de los 4 que no mostraron marcadores moleculares positivos, hasta el momento del corte del estudio, aún no presentaban recurrencia (Tabla 6).

Tabla 6. Comparación entre marcadores tumorales y la recurrencia

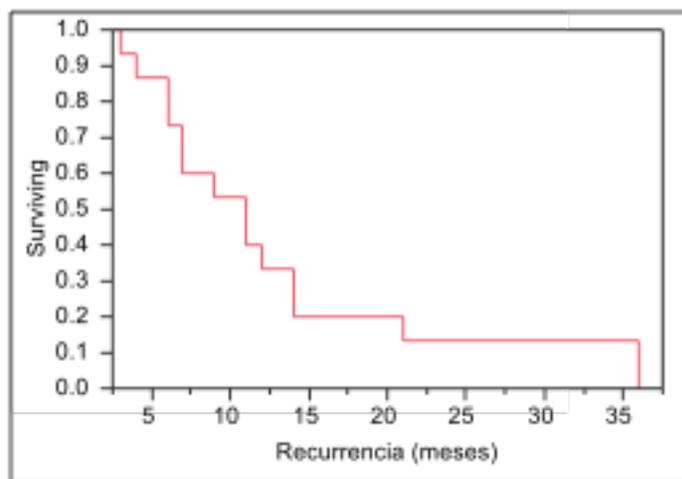
| Recuento | Recurrencia | | | Total |
|-------------------|-------------|----|----|-------|
| | | Si | No | |
| Marcador en lecho | Si | 15 | 0 | 15 |
| | No | 0 | 4 | 4 |
| Total | | 15 | 4 | 19 |

Con respecto a la recurrencia del tumor y su relación con la presencia de células tumorales en el estudio histopatológico, encontramos que de los 8 muestras diagnosticadas con células tumorales, 7 presentaron recurrencia tumoral en algún punto del seguimiento y 1 no, mientras que de las 11 muestras en donde no se observaron células tumorales, 8 presentaron recurrencia tumoral y solamente 3 no lo hicieron.

Tabla 7. Correlación entre el diagnóstico histopatológico y la recurrencia del tumor

| Recurrencia | | Recurrencia | | Total |
|-------------------|----|-------------|----|-------|
| | | Si | No | |
| Tumor histológico | Si | 7 | 1 | 8 |
| | No | 8 | 3 | 11 |
| Total | 15 | 15 | 4 | 19 |

La media de sobrevida libre de la patología fue de 13.33 meses, con un mínimo de 4 meses de recurrencia y un máximo de 43 meses, que fue el tiempo de corte del estudio, recordemos que los 15 tumores que presentaron marcadores tumorales positivos presentaron recurrencia (Gráfica 11).



Gráfica 11. Sobrevida libre de la enfermedad en los pacientes con recurrencia de la lesión

12. DISCUSIÓN

Los gliomas de alto grado de malignidad son lesiones que provocan gran morbimortalidad, las características de la población que se estudio coinciden con lo reportado de la epidemiología de estas neoplasias en cuanto a la edad de presentación, localización tumoral, edad de presentación, histología tumoral.

En nuestra población no existen antecedentes de este tipo de análisis asociado a la implementación de manejos más agresivos para la patología en cuestión, lo cual podría aportar gran cantidad de información que puede servir de guía para la elección más adecuada del tratamiento. Dentro de los resultados encontramos una mayor frecuencia de diagnóstico de gliomas de alto grado en el sexo femenino, sin haber una diferencia estadísticamente significativa, lo cual coincide con el resto de los reportes mundiales en los cuales no se observó predominancia de género, la localización frontal de los gliomas de alto grado en es otro de los datos que coinciden con la literatura mundial, en nuestra población se presento con una frecuencia de 47.4%, con una discreta predilección por el hemisferio izquierdo (10/19 tumores), como ya sabemos los gliomas tienen preferencia por zonas elocuentes.

La edad promedio de nuestros pacientes fue de 52.3 años con un rango mínimo de 23 años y máximo de 79 años, lo cual coincide con otros estudios clínicos reportados, al igual que en el grado de malignidad encontramos que el 57% de nuestra población presento como diagnóstico Glioblastomas (Grado IV), y según su estirpe celular el 73.7% (14 lesiones) eran derivados de los astrocitos.

Se realizó también la correlación entre la presencia de marcadores moleculares diagnosticados en las muestras del lecho quirúrgico en donde se encontraron positivos en 15 de las 19 con la presencia de células tumorales por histopatología de las mismas, en donde se observaron células tumorales en 9 de las 19 muestras. Se encontró recurrencia tumoral en 15 pacientes, con un seguimiento de 43 meses en total, que fue el momento de corte del estudio, 15 de los 19 pacientes presentaron recurrencia tumoral con un promedio de 13.3 meses. Se realizo la correlación entre los pacientes con que presentaron marcadores moleculares positivos y la recurrencia tumoral, así como los que presentaron células tumorales detectadas por histopatología y la recurrencia, observando que 15 de los 15 pacientes que presentaron marcadores moleculares positivos presentaron recurrencia tumoral, mientras que de los 10

pacientes en los que no se detectaron células tumorales por medio histopatológico 8 presentaron recurrencia tumoral.

También se realizó la correlación entre la detección de marcadores moleculares y la presencia de células tumorales diagnosticadas por histopatología con la supervivencia libre de la enfermedad, observando que de las 15 muestras identificadas con marcadores moleculares, solo 8 de ellas fueron identificadas por medios histopatológicos con células tumorales, en 7 de ellas no se observaron, mientras que de las 9 muestras identificadas con presencia de células tumorales por estudio histopatológico en 8 se encontraron marcadores moleculares positivos en 1 de ellos no se detectaron, así también llama la atención a su vez que coincidió con la literatura mundial, de las 10 muestras en donde no se identificaron células tumorales por medio histopatológico, en 7 de ellas si se detectaron marcadores tumorales, coincidiendo con la literatura mundial en donde los marcadores moleculares presentan una mayor sensibilidad, haciendo una correlación entre estos datos y la recurrencia de la lesión, todos los pacientes en quienes se identificaron marcadores moleculares positivos (15/15) presentaron recurrencia tumoral, y los 4 en donde no se encontraron sobre expresados, hasta el momento de corte del estudio aún no se presentaba recurrencia tumoral, el valor máximo de seguimiento en estos pacientes hasta el momento es de 43 meses y el mínimo de 14 meses, en los pacientes en quienes se observaron células tumorales por medio histopatológico, solo 1 de ellos no presentó recurrencia tumoral, que fue en quien no se presentaron marcadores moleculares positivos, de los 10 pacientes en quienes no se observaron células tumorales, 8 de ellos si presentaron recurrencia tumoral, lo que nuevamente nos lleva a coincidir con el resto de la literatura mundial, en donde los marcadores moleculares presentan mayor sensibilidad.

Se analizó la presencia de marcadores moleculares CD133, VEGF, FOX1*3, y A2B5 con la recurrencia tumoral; El marcador glial de superficie A2B5 se expresó de manera consistente en un gran porcentaje de células tumorales, el cual esta relacionado principalmente con el inicio y mantenimiento del glioma, más que con el comportamiento, se encontró positivo en 15 de nuestras 19 muestras, de las cuales 13 presentaron recurrencia tumorales, lo cual le confiere un riesgo relativo de recurrencia de 6.5 (0.55-76.17 IC 95%); la molécula CD133, es un marcador de células troncales de cáncer, que se ha relacionado positivamente con el pronóstico de varias neoplasias, incluida el glioblastoma, se correlaciona en diversos estudios con angiogénesis, que es un fenómeno indispensable para la supervivencia de un tumor, pues de allí depende su nutrición.

Como es bien sabido la molécula CD133 es menos abundante y menos consistente comparada con A2B5, en nuestra población estudiada lo encontramos positivo en 5 de los 15 pacientes presentando un riesgo relativo de recurrencia de 1.091 veces (0.86-13.77 IC 95%), 3 de estos 5 se presentaron en glioblastomas, presentando recurrencia a los 3, 4 y 22 meses de seguimiento respectivamente; FOX1*3 se presentó positivo en 16 pacientes de los cuales 15 presentaron recurrencia, otorgando un riesgo relativo de recurrencia de 4 (0.733-21.83 IC95%).

13. CONCLUSIÓN

Conocer las vías moleculares que subyace al cáncer ha logrado que se construyan moléculas dirigidas a blancos terapéuticos muy específicos, y que se mejore en forma ostensible el pronóstico de los pacientes.

A través de este estudio podemos concluir que detectar la presencia de marcadores tumorales nos ayuda a correlacionar con los tumores que presentaran recurrencia, En conjunto, estos resultados demuestran que los gliomas humanos contienen múltiples poblaciones de células con la capacidad de formar tumores, y la detección del marcador glial de superficie A2B5+ y CD133+ esta asociado con la recurrencia tumoral, por lo que dirigirse eficazmente a estos puede reducir eficazmente la invasión y recurrencia de los gliomas de alto grado.



14. ANEXO

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN Y POLÍTICAS DE SALUD COORDINACIÓN DE
INVESTIGACIÓN EN SALUD

HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI SERVICIO DE
NEUROCIRUGÍA

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN PROYECTOS DE
INVESTIGACIÓN

TÍTULO: ANÁLISIS MOLECULAR E HISTOPATOLÓGICO DEL LECHO QUIRÚR-
GICO EN PACIENTES OPERADOS DE GLIOMAS DE ALTO GRADO DE MALIGNI-
DAD COMO FACTORES PRONÓSTICOS DE RECURRENCIA.

LUGAR Y FECHA: _____ NO. DE REGISTRO: _____

Le invitamos a participar en el estudio " Análisis molecular e histopatológico del lecho quirúr-
gico en pacientes operados de gliomas de alto grado de malignidad como factores pronósticos de
recurrencia". Le pedimos leer cuidadosamente esta carta, si hay palabras o términos que Ud.
no comprenda, por favor pida al médico o al personal que le dio este formato le aclaren
cualquier duda.

1. Justificación y objetivo

En el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS en el periodo
2005 – 2011 se atendieron a 1,257 pacientes con tumores intracraneales, de los cuales 41.3%
tu- vieron diagnóstico de glioma y entre ellos, el glioblastoma predominó con un 46.8%.

El presente estudio tiene como objetivo analizar la presencia de los marcadores moleculares
GFAP, OLIG2, FOXM1*3, VEGF, MGMT, CD-133, CD-15 y A2B5 en el lecho quirúrgico de
pacientes operados de gliomas de alto grado de malignidad y su relación como factores
pronósti- cos de recurrencia.

2. Procedimiento.

Se le van a realizar todos los estudios y tratamiento necesarios para pacientes con si misma enfermedad, para lo cual es necesario que asista a su consulta habitual de 4 visitas por año durante 5 años, en cada visita tendrá que asistir a los servicios de neurocirugía y neurología, y posteriormente radio oncología, lo que le llevara un total de 2-4 hrs en los hospitales por día.

Si usted decide aceptar participar en este protocolo, se le solicitara su autorización para tomar un pedazo de tumor o glioma durante la cirugía y por única vez. También quisiéramos saber si esta de acuerdo en que conservaremos la muestra para que en el futuro podamos hacer otros estudios complementarios.

Se realizaran pruebas neuropsicológicas mediante la aplicación de 5 cuestionarios, estas pruebas se realizaran el mismo día de sus visitas programadas a los hospitales.

3. Posibles riesgos y molestias:

El protocolo no representa ningún riesgo para su salud, pero si puede sentir alguna molestia si los resultados en las pruebas neuropsicológicas no son lo que usted esperaba, ya que estas pruebas determinan su estado de animo, independencia en sus actividades y capacidad para realizar ejercicios de memoria o que requieran de su atención.

4. Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio

No recibirá algún beneficio por participar en este estudio. En beneficio será para los pacientes futuros al momento que identifiquemos los marcadores moleculares que hacen que los tumores tengan recurrencia más rápido, afectando la salud del paciente más rápidamente. Toda esta información permitirá al medico a tomar mejores desiciones con respecto al tratamiento a elegir y a los cuidados que se deberán realizar después de la operación, para que les ayude a vivir más tiempo y con una vida más independiente de sus familiares.

5. Participación o retiro.

Su participación en este estudio es completamente voluntario. Si usted decide no participar, seguirá recibiendo la atención médica brindada por el IMS, se le ofrecerán los procedimientos establecidos dentro de los servicios de atención médica del IMSS. Es decir, que si usted no desea participar en el estudio, su decisión, no afectara su relación con el IMSS y su derecho a obtener los servicios de salud u otros servicios que recibe del IMSS.

Si en un principio desea participar y posteriormente cambia de opinión, usted puede abandonar el estudio en cualquier momento. El abandonar el estudio en momento que quería no modificará de ninguna manera los beneficios que usted tiene como derechohabiente del IMSS. Para los fines de esta investigación sólo utilizaremos la información que usted nos ha brindado desde el momento en que acepto participar hasta el momento en el cual nos haga saber que ya no desea participar.

6. Privacidad y confidencialidad

La información que nos proporcione que pudiera ser utilizada para identificarlo/a (como su nombre, teléfono y dirección) será guardado de manera confidencial y por separado al igual que sus respuestas a los cuestionarios, los resultados de sus pruebas clínicas y moleculares, así como las evaluaciones neurológicas y neuropsicológicas, para garantizar su privacidad.

El equipo de investigación y médicos especialistas involucrados en el cuidados de su salud sabrán que usted está participando en este estudio. Sin embargo, nadie más tendrá acceso a la información que usted nos proporcione durante su participación en este estudio, al menos que usted así lo desee.

7. Personal de contacto para dudas y aclaraciones sobre el estudio.

Si tiene alguna pregunta o quiere hablar con alguien sobre este estudio de investigación puede comunicarse de 9-16 hrs de lunes a viernes con el Dr. Israel Grijalva Otero investigador responsable de la unidad de investigaciones Medicas a los teléfonos 55 78 02 40 y 56 27 69 00 extensión 21365 o 21366 del IMSS.

8. Personal de contacto para dudas sobre sus derechos como participante en un estudio de investigación.

Si usted tiene dudas o preguntas sobre sus derecho al participar en un estudio de investigación puede comunicarse con los responsables de la comisión de ética en investigación 56276900 21216 de 9-16 hrs.

9. Por favor marque con una X la opción que se presente a bajo

Si, autorizo que se tome parte del tejido tumoral durante mi cirugía para las pruebas de marcadores genéticos únicamente en este estudio.

Si, autorizo que se tome parte del tejido tumoral durante mi cirugía para las pruebas de marcadores genéticos de este estudio y su empleo para futuros estudios.

10. Declaración del consentimiento informado

Se me ha explicado con claridad en que consiste este estudio, declaro haber leído (o que alguien me ha leído) el contenido de este formato de consentimiento. Comprendí todas las explicaciones que me dieron y tuve oportunidad de hacer pregunta y todas mis preguntas han sido contestadas con satisfacción. Al firmar este formato estoy de acuerdo con participar en el estudio que se describe.

Nombre y firma del paciente _____

Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento
----- Nombre y firma del Testigo 1

Nombre y firma del Testigo 2 _____

15. BIBLIOGRAFIA

- ¹ Hong-xiang Wang, Rong Qin, Jian Mao Qi-lin Huang, Fan Hong, Feng Li, Zhen-yu Gong Tao Xu, Yong Yan, Shao-hui Chao, Shi-kun Zhang, Ju-xiang Chen, CPEB4 regulates glioblastoma cell proliferation and predicts poor outcome of patients, *Clinical Neurology and Neurosurgery* 169 (2018) 92-97.
- ² Huttner A. Overview of primary brain tumors pathologic classification, epidemiology, molecular biology, and prognostic markers. *Hematol Oncol Clin N Am.* 2012; 26:715–732.
- ³ Huttner A. Overview of primary brain tumors pathologic classification, epidemiology, molecular biology, and prognostic markers. *Hematol Oncol Clin N Am.* 2012; 26:715–732.
- ⁴ Marc C. Chamberlain, M.D. Treatment options for glioblastoma, *Neurosurg Focus* 20 (4):E19, 2006.
- ⁵ Mahlon D. Johnson, James B. Atkinson, *Central Nervous System Tumors, Modern Surgical Pathology (Second Edition)*, 2009, 1984-2038.
- ⁶Dominique Figarella-Branger, Webster K. Cavenee, Hiroko Ohgaki, Otmar D. Wiestler, Paul Kleihues, David W. Ellison. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary, DOI 10.1007/s00401-016-1545-1.
- ⁷ Isabelle M. Germano, MD, “Introduction: High-Grade Gliomas”, *Neurosurg Focus* 14 (2), 2003.
- ⁸ Montserrat Lara Velazquez, Rawan Al-Kharboosh, Stephanie Jeanneret, et al. Advances in Brain Tumor Surgery for Glioblastoma in Adults. *Brain Sic.* 2017 Dec; 7(12): 166.

⁹ Seok-Joo Chun, Sung-Hye Park, Chul-Kee Park et al. Survival gain with re-Op/RT for recurred high-grade gliomas depends upon risk groups, *Radiotherapy and Oncology* xxx (2018).

¹⁰ Michael Karsy, Jayson A. Neil, Jian guan, Mark A. mahan, Howard colman, and randy I. Jensen. A practical review of prognostic correlations of molecular biomarkers in glioblastoma. *Neurosurgery Focus* 38 (3): E4, 2015.

¹¹ Arsela Prelaj, Sara Elena Rebuzzi, Giovanni Caffarena, Therapeutic approach in glioblastoma multiforme with primitive neuroectodermal tumor components: Case report and review of the literature, *Oncology Letters* 15: 6641-6647.

¹² Anne Line Stensjøen, Erik Magnus Berntsen, Asgeir Store Jakola, Ole Solheim When did the glioblastoma start growing, and how much time can be gained from surgical resection? A model based on the pattern of glioblastoma growth in vivo, *Clinical Neurology and Neurosurgery* 170 (2018) 38-42.

¹³ Melike Pekmezci, and Arie Perry, Genetic Markers in Adult High-Grade Gliomas, Elsevier 2014, 1053-4296.

¹⁴ Prados MD, Byron SA, Tran NL, et al. Toward precision medicine in glioblastoma: the promise and the challenges. *Neuro Oncol.* 2015;17(8):1051.

¹⁵ Diane J. aum, B.S., David H. Kim, m.S., Thomas L. Beaumont, Eric c. LeuTHarDT Gavin P. Dunn, and Albert H. Kim. Molecular and cellular heterogeneity: the hallmark of glioblastoma, *Neurosurg Focus* 37 (6):E11, 2014.

¹⁶ Fernando González Trujillo, Camila Castro Noriega, Oscar Javier Castro Ramírez, Natalia Olaya, Pedro José Penagos González, Camilo Zubieta Vega, Gonzalo Melo Gómez, Multiform glioblastomas: current discussions on biomolecular markers as factors for prognosis regarding a series of cases with a survival rate over 2 years in the Instituto Nacional de Cancerología INC-Colombia. *Acta Neurol Colomb.* 2014; 30(4):282-289.

¹⁷ Diane J. Aum, David H. Kim, Thomas L. Beaumont, et al. "Molecular and cellular heterogeneity: the hallmark of glioblastoma", *Neurosurg Focus* 37 (6): E11, 2014.

¹⁸ Severina Leu, Jean-Louis Boulay, Sarah Thommen, Heiner C. Bucher, Christoph Stippich, Luigi Mariani, Andrea Bink. Preoperative Two-Dimensional Size of Glioblastoma is Associated with Patient Survival. *World Neurosurgery* 2018.

¹⁹ Richard J. Gilbertson and Jeremy N. Rich, Making a tumour's bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche, *Nature Publishing Group*. 2007; (7): 733-736.

²⁰ Sanai N, Berger MS. Glioma extent of resection and its impact on patient outcome. *Neurosurgery*. 2008; 62:753-66