

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**Facultad de Medicina**

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
CENTRO MÉDICO NACIONAL “SIGLO XXI”**

**Hospital de Pediatría**

*Tesis para obtener título de pediatra:*

**ASOCIACION DE LA EXPRESIÓN DE CD133 (PROMININ-1) CON EL  
PRONÓSTICO DE PACIENTES CON ASTROCITOMAS EN EDAD PEDIÁTRICA**

**Tesista**

**Abril Adriana Arellano Llamas<sup>1</sup>**

**Investigador Responsable:**

**Enrique López Aguilar<sup>2</sup>**

**Investigadores Asociados:**

**Ignacio Félix<sup>3</sup>**

**Ana Sepúlveda Vildosola<sup>4</sup>**

- 1. Residente de cuarto año de la especialidad en Pediatría Médica del Hospital de Pediatría del CMNSXXI**
- 2. Médico Pediatra Oncólogo adscrito al servicio de Oncología Pediátrica del Hospital de Pediatría del CMNSXXI**
- 3. Neuropatólogo adscrito al servicio de Patología del Hospital de Especialidades CMNSXXI**
- 4. Jefa del servicio de Enseñanza e Investigación en Salud del Hospital de Pediatría del CMNSXXI**



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.

**ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CD133 (PROMININ-1) CON EL PRONÓSTICO DE  
ASTROCITOMAS EN POBLACIÓN PEDIÁTRICA.**

**Entrega de correcciones de tesis.**

Lista de sinodales por orden alfabético:

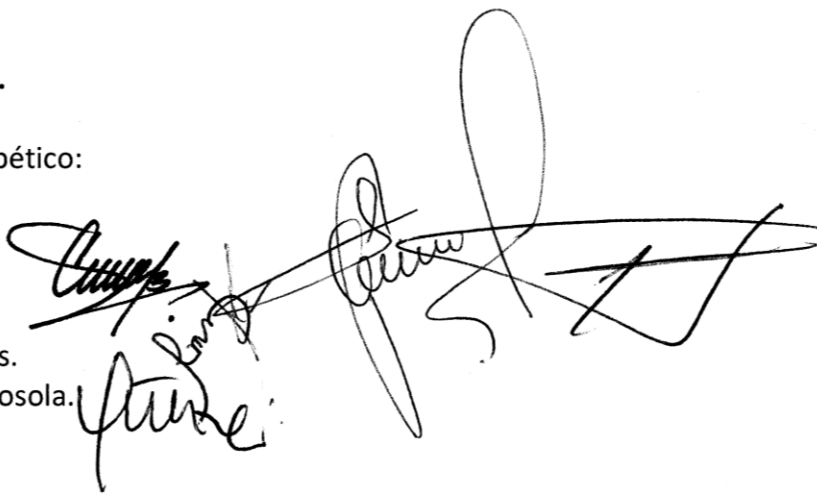
Dr. Jesús Arias Gómez.

Dra. Carolina Barrientos Salcedo.

Dr. Héctor González Cabello.

Dra. Alma Griselda Ramírez Reyes.

Dra. Ana Carolina Sepúlveda Vildosola.

The image shows five handwritten signatures in black ink, arranged horizontally. From left to right, they correspond to the names listed in the text: Jesús Arias Gómez, Carolina Barrientos Salcedo, Héctor González Cabello, Alma Griselda Ramírez Reyes, and Ana Carolina Sepúlveda Vildosola. The signatures are stylized and vary in complexity, with some featuring large loops and others being more compact.

## Dedicatoria

*El esfuerzo de esta tesis se lo dedico a:*

*Mis padres, por ser mi más grande apoyo. Los amo.*

*Ángeles, por ser un ejemplo de vida. Te admiro mamá.*

*José María, por ser siempre un líder, aun en los momentos difíciles. Te admiro papá.*

*Álvaro, por ser un motor en mi vida. Te amo.*

*Mis hermanos, por ser mis mejores amigos. Los quiero.*

*Doctor López, por permitirme ser parte del grupo y darme libertad en esta tesis. Mil gracias, lo respeto profundamente.*

*A los pacientes por tenerme confianza. Gracias niños.*

*A mis compañeros, por ser amigos en las buenas y las malas. Gracias a todos.*

*A mis profesores, por enseñarme grandes cosas. Gracias a todos.*

## INDICE

RESÚMEN .....	5
ANTECEDENTES.....	6
JUSTIFICACIÓN .....	10
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	10
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	10
OBJETIVOS .....	10
HIPOTESIS .....	10
MATERIAL Y MÉTODOS .....	11
RESULTADOS.....	14
DISCUSIÓN .....	18
CONCLUSIONES.....	20
BIBLIOGRAFÍA .....	21
ANEXO .....	24

## ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CD133 (PROMININ-1) CON EL PRONÓSTICO DE ASTROCITOMAS EN POBLACIÓN PEDIÁTRICA

### RESÚMEN

El cáncer cerebral en la edad pediátrica ocupa el primer lugar de todas las tumoraciones solidas, los astrocitomas representan el 60% de los casos. El cáncer se origina de células troncales que se marcan positivamente con CD133, y su expresión se ha asociado con mal pronóstico en el glioma de los adultos, sin embargo, el comportamiento molecular de los gliomas de los adultos y niños es diferente y no existen reportes de la asociación de CD133 con el pronóstico de esta tumoración en pacientes pediátricos. Por otro lado CD133 se ha relacionado con la angiogénesis tumoral. Realizamos un estudio ambispectivo, observacional, longitudinal y comparativo. Se incluyeron casos con diagnóstico de astrocitoma de cualquier grado entre 1995 y 2008, que recibieron tratamiento estándar, se recopiló información clínica y se obtuvieron muestras tumorales previo al tratamiento de bloques de parafina para fines diagnósticos de los cuales se tomó una muestra y se realizó inmunohistoquímica (CD133 Cell Signaling clona C24B9). Se encontraron 30 casos que cumplieron con los criterios de inclusión, hombres 50% de la muestra, mediana de edad 78.8 meses (rango 16-192), menores de tres años 10%, histología: bajo grado 70%, astrocitoma anaplásico 20%, glioblastoma multiforme 10%; inmunohistoquímica positiva para CD133 14 casos con tinción membranal y citoplasmática. Los tumores de alto grado fueron positivos para CD133 en 66.6% de los casos mientras que los de bajo grado 52% ( $p=0.240$ ). La supervivencia del grupo CD133+ fue 22.5% menor que la del grupo CD133- (Log Rank Test 0.2749). Los astrocitomas en niños que muestran expresión de CD133 tuvieron menor supervivencia aunque no hubo significancia estadística debido a que la heterogeneidad de la muestra, se observan diferencias de la expresión de CD133 en los diversos grados de los tumores, siendo mayor en los de alto grado. Los tumores CD133 positivos deberían recibir tratamientos más agresivos que incluyan antiangiogénicos.

## ANTECEDENTES

Los tumores del sistema nervioso central (SNC), son los tumores sólidos más comunes en la infancia. En nuestro país representan el 10% de los cánceres infantiles (incluyendo leucemias y linfomas), y para nuestro hospital el 6.1% de los egresos hospitalarios<sup>1</sup>.

Los astrocitomas son los tumores del sistema nervioso central (SNC) más comunes<sup>2</sup>. Actualmente, la OMS utiliza una escala de grados para clasificarlos (Grado I, II, III y IV) en función de la conducta biológica, conforme avanza el grado el tumor es más agresivo<sup>3 4</sup>, además con esta clasificación se predice respuesta al tratamiento y pronóstico<sup>4</sup>.

El pronóstico de los astrocitomas grado IV, en series que contienen pacientes pediátricos y adultos, la supervivencia media raramente excede los 12 meses<sup>3,4</sup>. Un estudio realizado en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, en astrocitomas de alto grado, en el que se utilizó quimioterapia (ifosfamida, carboplatino y etopósido) previo a la radiación, consiguió supervivencia global a 60 meses del 67% de los casos y libre de enfermedad del 56%<sup>5</sup>.

### *Astrocitomas de bajo grado.*

Los astrocitomas de bajo grado (Grado I y II de la OMS) representan el 11% de los tumores primarios del SNC. Algunos de éstos pueden desarrollar una diferenciación maligna con el paso del tiempo y dar lugar a glioblastomas secundarios (lesiones grado IV); existe progresión en 50 a 70% de los gliomas de bajo grado para transformarse en alto grado<sup>3</sup>. Aunque de forma típica son más indolentes que sus contrapartes de alto grado, pueden asociarse con discapacidad neurológica y muerte. Tienen una supervivencia media de 5 a 7 años de 95%<sup>6</sup>, con variación individual importante.

Las opciones de manejo incluyen cirugía, seguida de radioterapia y una aproximación conservadora de “esperar y vigilar”. Respecto al pronóstico de los astrocitomas de bajo grado existen varios factores: la histología del tumor, las alteraciones genéticas (pérdidas alélicas de cromosomas 1p y 19q), y la presentación clínica (mejor si al diagnóstico hay déficit neurológico, si la presentación es con crisis convulsivas)<sup>3,7</sup>.

### *Astrocitomas de alto grado.*

Los astrocitomas de alto grado (grado III y IV de la OMS) son cánceres con alta letalidad, representan el 5% de los tumores del SNC. Aparecen como lesiones de forma irregular con reforzamiento parcial al contraste y edema peritumoral y pueden cursar o no con efecto de masa<sup>6</sup>. Los tratamientos actuales incluyen cirugía, quimioterapia y radiación<sup>2</sup>. Con esta aproximación terapéutica se ha alcanzado, en niños, supervivencia global del 67% a 60 meses y libre de enfermedad de 56% en el mismo lapso en nuestro hospital<sup>2</sup>. Con la utilización de drogas antiangiogénicas en esquemas metronómicos en pacientes pediátricos, se observa reducción significativa del volumen tumoral (20cc a 8.7cc ( $p < 0.05$ )) e incremento significativo de la supervivencia a 24 meses (supervivencia actuarial de 71.59%), los pacientes bajo este tratamiento mejoran su calidad de vida (Karnofsky de 50 a 70%). Este tratamiento incrementa la tasa de

supervivencia en pacientes pediátricos con astrocitomas malignos de tallo cerebral provocando poca toxicidad<sup>5</sup>.

El factor pronóstico favorable más importante es la resección radical (más del 90%), sin embargo, sólo el 49% de los tumores localizados en los hemisferios y el 8% de los de línea media o cerebro profundo son susceptibles de resección radical<sup>6</sup>.

Se conoce que en adultos la carcinogénesis del glioblastoma multiforme sigue dos rutas bien establecidas (GBM secundario, a partir de un astrocitoma de bajo grado que expresa alteraciones en p53, y el primario que exhibe mutaciones principalmente en EGFR). Sin embargo, el comportamiento molecular de los tumores cerebrales en los niños es diferente, por ejemplo, aunque los gliomas de alto grado de adultos sobreexpresan la proteína EGFR, la amplificación del gen es rara en niños. Es por ésta razón que las observaciones obtenidas de los glioblastomas multiformes en adultos no son extrapolables a la población pediátrica<sup>6,8</sup>.

La estratificación por riesgo es muy importante. El análisis del riesgo puede diferenciar a los pacientes en un grupo que requiera tratamiento agresivo de un grupo de bajo riesgo para el que es suficiente un protocolo terapéutico de menor agresividad<sup>9</sup>. Se ha demostrado bajo este enfoque que existen dos grupos de glioblastoma multiforme pediátrico, uno asociado con la vía de activación de Akt y Ras, que tiene un pronóstico muy malo y exhiben genes relacionados a la proliferación, y que tiene un fenotipo similar a célula troncal que está asociado con índices de proliferación más acelerados<sup>8</sup> y por lo tanto peor pronóstico.

Origen del cáncer.

Sólo pocas células atípicas dentro de la masa tumoral son responsables del crecimiento y recurrencia de algunos cánceres cerebrales. La evidencia indica que estas células son células troncales peculiares, transformadas a tipo celular de sistema nervioso central, con habilidad de iniciar cáncer, una célula tumoral cerebral troncal<sup>10</sup>.

Las células troncales tienen las capacidades que requieren las células para ser cancerosas<sup>11-12</sup>: evadir la apoptosis; ser autosuficientes en señales de crecimiento; ser insensibles a señales que limitan crecimiento; promover angiogénesis sostenida; tener potencial replicativo ilimitado y tener capacidad de invasión tisular y metástasis<sup>13</sup>.

El marcador de células troncales CD133 se describió en células humanas hematopoyéticas<sup>14-15</sup> y células neuroepiteliales murinas y posteriormente en varios epitelios embrionarios, endotelio, células linfangiógenicas y mioangiogénicas<sup>16-17</sup>. Su función es desconocida, pero se reconoce como marcador de células troncales de tejidos normales y cancerosos. Actualmente se utiliza solo o en combinación con otros marcadores para aislar células troncales de varios tejidos, como médula ósea<sup>14-15</sup>, cerebro<sup>18-19</sup>, riñón<sup>20</sup>, próstata<sup>21</sup>, hígado<sup>22</sup>, páncreas<sup>23-24</sup> y piel<sup>25</sup>. Se han observado datos que sugieren que este marcador podría tener relación con la carcinogénesis por dos vías, la tumorigénesis y la angiogénesis.



CD133 y cáncer de Sistema Nervioso Central.

Las células tumorales CD133+ son tumorigénicas. Singh 2003<sup>10</sup>, describió *in vitro* que las células CD133+ de un glioblastoma multiforme son capaces de generar esferas tumorales y cáncer xenográfico fenotípicamente igual que el del paciente del que se obtuvieron estas células.

Las células troncales CD133+ son capaces de generar vasos sanguíneos, y se sabe que la angiogénesis es uno de los determinantes indispensables para la carcinogénesis<sup>13</sup>. Este fenómeno depende del crecimiento de vasos preexistentes y la movilización, reclutamiento, proliferación de células progenitoras endoteliales derivadas de médula ósea (CEP)<sup>26,27-28</sup>. Se sabe que CD133 es un marcador de células angiogénicas derivadas de médula y se han observado en cáncer de pulmón<sup>29</sup>, mama<sup>30</sup>, colorrecto<sup>31-32</sup> y próstata, de metástasis óseas, desórdenes mielodisplásicos, mieloma múltiple<sup>33-34</sup> y hemangiomas infantiles<sup>35</sup>. Se ha descrito que las células CD133 de un tumor son capaces de sufrir diferenciación hacia células endoteliales asegurándole al tumor los elementos nutricios para su crecimiento<sup>36</sup>.

La expresión de CD 133 se ha correlacionado con mal pronóstico en varios tipos de cáncer: colorrectal<sup>37-38</sup>, hepatocelular<sup>39-40</sup>, neuroblastoma<sup>40</sup>, oligodendroglioma<sup>41</sup>, páncreas<sup>42</sup> y melanoma<sup>43</sup>. También se correlaciona su expresión con la radiosensibilidad de algunos tumores<sup>44</sup>.

Se ha estudiado la expresión de CD133 en astrocitomas de adultos un estudio realizado en 95 pacientes con glioma se observó que en los tumores de bajo grado (OMS II, n=24) la expresión no es detectable o se expresa solo en 1% de las células que constituyen el tumor. En tumores de mayor grado como gliomas anaplásicos (OMS III, n=24) y glioblastomas (OMS IV, n=47) la proporción de tumores positivos para CD133 en >1% del volumen tumoral fue de 38% para grado III y 96% para grado IV, además con mayor grado de malignidad, el agrupamiento de células CD133+ alrededor de los vasos fue más frecuente (33% en grado III y 87% en grado IV) y estuvo ausente por completo en los tumores grado II<sup>45</sup>.

En este mismo estudio se demostró que la expresión de CD133 se asocia con menor supervivencia libre de progresión y supervivencia global, las diferencias se establecieron con un nivel de corte de expresión de 1% del volumen tumoral. El análisis multivariado confirmó que la expresión de CD133 en más del 1% del tumor concede un riesgo de 17.46 (IC 95%, 5.49-55.52) y la organización topológica en agrupamiento un riesgo 5.62 (IC 95%, 2.04-15.51)  $p < 0.001$  como elementos pronósticos significativos de menor supervivencia global independientes del grado OMS del tumor, edad, o extensión de la resección, resultados similares para supervivencia libre de progresión con células positivas y con formación en grupos (OR, 8.13; 95% CI, 3.63-18.25;  $p < 0.001$ ) y (OR, 4.67; 95% CI, 1.94-11.23), respectivamente<sup>45</sup>.

Por otro lado, también se ha encontrado que CD 133 es un marcador de recurrencia tumoral o de progresión maligna hacia un grado mayor de malignidad; la expresión elevada de CD133 se asocia a mayor incidencia de recaída tumoral. Todos los pacientes con expresión en >1% del tumor recayeron en los grupos de grado II (n=3) y III (n=9) de la OMS, en contraste con sólo un tercio de pacientes con < 1% de expresión (grado II 7 de 21 y grado III 5 de 15). Los pacientes con gliomas

grado III, progresaron frecuentemente hacia grado IV cuando sus tumores expresaron CD133, la progresión fue más rápida y la supervivencia global peor<sup>45</sup>.

En la literatura no hay reportes de la relación de la expresión del marcador CD133 con el pronóstico de los astrocitomas en los pacientes pediátricos.

## **JUSTIFICACIÓN**

Los tumores sólidos más comunes en la infancia son los del Sistema Nervioso Central, y de éstos, los astrocitomas representan el 60% de todos los tumores cerebrales en pediatría, y hasta la mitad de ellos son de alto grado por lo que hay gran morbilidad por este motivo. Conocer marcadores moleculares de pronóstico en el astrocitoma en la edad pediátrica es de utilidad clínica, para establecer el pronóstico y con la evolución de la biología molecular y la generación de blancos terapéuticos prediseñados, también para decidir un tratamiento adecuado para cada caso en función del comportamiento biológico de cada tumor.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Los tumores cerebrales son la neoplasia sólida más común en la edad pediátrica, los astrocitomas son un grupo de neoplasias cerebrales que se dividen en dos grandes grupos según su malignidad (bajo y alto riesgo) y el comportamiento molecular de estos tumores en la edad pediátrica no se ha elucidado por completo y se ha observado que sólo una parte de las células dentro del tumor tiene capacidad carcinogénica en modelos in vivo, y expresan el marcador de células troncales de cáncer CD133. La expresión de este marcador en astrocitomas de pacientes adultos se asocia con el pronóstico y grado de la enfermedad, sin embargo, en población pediátrica, el comportamiento molecular de los gliomas es diferente al de los adultos, y no se ha establecido la expresión de CD133 ni su asociación con el pronóstico de la enfermedad.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Existe asociación entre la expresión de la molécula CD133 con la supervivencia de los pacientes pediátricos con astrocitoma?

## **OBJETIVOS**

### **General.**

Determinar si la expresión de la molécula CD 133, en los astrocitomas de pacientes pediátricos, se asocia con el pronóstico de los pacientes.

### **Particular.**

Determinar si existe correlación entre la expresión de CD133 y la histología del astrocitoma.

## **HIPOTESIS**

Los pacientes con astrocitomas CD 133+ tendrán una supervivencia <30% respecto a los pacientes con astrocitomas CD133-.

Los pacientes con astrocitomas CD133+ se correlacionarán con histologías de alto riesgo en el 70% de los casos.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### ***Tipo de estudio.***

Se realizó un estudio ambispectivo; es un estudio observacional , longitudinal y comparativo, constituido por una cohorte que se clasificó y comparó en función de la expresión de CD133.

### ***Universo y Muestra.***

La población que se examinó estuvo constituida por pacientes con astrocitoma de alto y bajo grado que fueron diagnosticados en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI entre Enero de 1995 y Diciembre de 2008.

### ***Criterios de inclusión.***

1. Pacientes con diagnóstico de certeza (por patología) de astrocitoma, realizado durante el periodo comprendido entre el 1 de Enero de 1995 y 31 de Diciembre de 2008.
2. Pacientes de cualquier sexo, entre 1 y 17 años de edad.
3. Que no hubieran recibido ningún tratamiento al momento de obtenerse la muestra del tejido tumoral.
4. Expediente completo para establecer curso clínico de la enfermedad.
5. Tiempo mínimo de observación de 2 meses.

### ***Criterio de eliminación.***

1. Pacientes con expediente incompleto.
2. Muestra tumoral insuficiente o inapropiada para la realización de inmunohistoquímica.

### ***Tamaño de muestra.***

Utilizando la fórmula para el cálculo del tamaño de la muestra, para comparar proporciones de variables dicotómicas, con una diferencia probable del 30% para sobrevivida entre grupos, y una sobrevivida actual de los pacientes con astrocitomas de alto grado en el HP CMN SXXI, se requerían 28 pacientes (alfa de 0.05 y beta de 0.20).

### ***Metodología para determinar la expresión de CD 133.***

Se obtuvo muestra del tejido tumoral la cual se mantenía conservada en parafina en el archivo histológico del servicio de patología. De esta muestra, un médico patólogo, ciego a la evolución del paciente, efectuó diagnóstico histológico y determinó el grado de malignidad con la escala de la OMS. Por otro lado se realizó inmunohistoquímica para determinar la expresión de la molécula CD133 en el tumor.

### *Inmunohistoquímica<sup>37</sup>.*

De las muestras parafinizadas del tumor se realizaron cortes de 3 micras de espesor, se desparafinaron y rehidrataron: se bañaron las laminillas en xileno por 5 minutos, se retiró el exceso, se bañaron entonces con alcohol absoluto por 3 min, posteriormente en alcohol al 95%, al 70% por tres minutos cada uno, se retiró el exceso de alcohol y se lavaron finalmente con agua desionizada por 30 segundos.

Para exponer el epítotope de CD133 se dio tratamiento con una solución a base de citrato comercial (DakoCytomation Target Retrieval Solution) en una olla de presión que se calentó hasta 120°C. Se permitió el enfriamiento a temperatura ambiente de las muestras.

Se lavaron dos veces las muestras con TBS-T, se aplicó albúmina sérica de vaca como agente bloqueante de sitios inespecíficos de reacción permitiendo una incubación por 10 minutos. Sin lavar se aplicó el anticuerpo monoclonal primario de conejo anti CD133 (1:100 clona C24B9, Cell Signaling Danvers, MA, USA) y se incubó por media hora. Se lavó dos veces con TBS-T. Se agregó finalmente el anticuerpo secundario (anti-conejo) que se incubó por 1 hora. Se lavó en dos ocasiones. Se añadió finalmente la solución reveladora (diaminobenzidina) que se incubó por 5 minutos y se lavó nuevamente y se contratiñó finalmente con hematoxilina.

El control negativo se sometió a toda la metodología, excepto la aplicación de anticuerpo primario. Durante la realización del protocolo se logró caracterizar un control positivo, el cual fue tomado de una muestra de riñón sano pediátrico, en el que se observó tinción positiva para las células glomerulares únicamente. La tinción fue citoplasmática y membranal, con una intensidad adecuada y con este control se estableció la metodología de la inmunohistoquímica.

Se determinó la reacción en microscopio de luz y se tomaron fotografías, se caracterizó como ausencia de expresión, expresión positiva(>1%) y se clasificó en moderada(<50%) y alta (>50%).

La observación de la inmunohistoquímica fue realizada por un médico neuropatólogo experto, quien revisó 10 campos de alta resolución, contó las células tumorales observadas por campo, y de éstas, el número de células positivas y estableció el porcentaje de positividad.

### *Seguimiento de los pacientes.*

Referirse al anexo correspondiente.

### *Estadística.*

Se utilizó estadística descriptiva para caracterizar la muestra. Se determinó la Kurtosis y lordosis para establecer el tipo de estadística apropiada para el análisis. Se realizó curva de supervivencia con función de supervivencia actuarial y se probó la diferencia entre los grupos con la prueba de Log Rank. Se realizó prueba de Chi cuadrada para determinar la asociación de las variables cualitativas y el OR para determinar el riesgo de morir.

*Definición de las variables.*

Variable	Tipo de variable	Escala de medición	Definición conceptual	Definición operacional	Unidades de medición	Dependiente/ independiente	Control
Edad	Universal	Cuantitativa: Continua	Tiempo de vida en años.	Edad cumplida en años	Años	Independiente	Fecha de nacimiento
Sexo	Universal	Cualitativa: Nominal	Características fenotípicas que califican al sujeto en género femenino o masculino	Género fenotípico	Masculino Femenino	Independiente	Fenotipo genital observado
Tumor localización	Universal	Cualitativa: Nominal	Localización intracraneal del tumor <sup>5</sup>	Lugar que ocupa el tumor <sup>5</sup> dentro del cráneo	Supratentorial Infratentorial Tallo cerebral	Independiente	Visualización del estudio de imagen
Histología tumoral	Dependiente	Cualitativa: Nominal	Categorización de la tumoración según características de malignidad con la clasificación de la OMS <sup>4</sup>	Categorización de la tumoración según características e malignidad por patólogo que estableció el diagnóstico con la clasificación de la OMS <sup>4</sup>	Bajo grado Astrocitoma anaplásico Glioblastoma multiforme	Independiente	Definición por un patólogo cegado de la intención el estudio y de los resultados de IHQ
Expresión CD133	Independiente	Cualitativa: Ordinal	Observación de la tinción de inmunohistoquímica dirigida por medio de anticuerpo monoclonal contra la epítome de CD133 <sup>37</sup>	<sup>37</sup> Tinción por inmunohistoquímica de las muestras	Negativo Positivo (>1% de la muestra)	Independiente	Observación por neuropatólogo o experto
Supervivencia	Dependiente	Cuantitativa: Continua	Tiempo transcurrido entre el diagnóstico inicial y la presentación de la muerte o de la última cita del paciente <sup>5</sup>	Tiempo transcurrido entre el diagnóstico inicial y la presentación de la muerte o de la última cita del paciente <sup>5</sup>	Meses	Dependiente	

## RESULTADOS

Se obtuvo una muestra inicial de 32 casos, de los cuales dos se tuvieron que descartar por mala calidad de la muestra tumoral (ambos lesiones de bajo grado), el seguimiento fue de 6 a 169 meses. Se describen a continuación las características de la muestra (tabla 1) se constituyó por pacientes del género masculino en el 50% de los casos. Se clasificó a la muestra por edades, los menores de 3 años representaron el 10% de la muestra, desde 3 años y hasta 6 años 40% de la muestra, mayores de 6 años hasta 9 años 16.7% de la muestra, 9 a 12 años el 13.3% de los casos y mayores de 12 años 20% de los casos, la mediana de edad fue de 78.58 meses (13.2 años) con un rango de 16 a 192 meses. La supervivencia de los pacientes en forma global, fue de 56.7% (17/30) y el rango fue de 2 a 169 meses.

Los tumores analizados fueron de bajo grado en el 70% de los casos (21/30), astrocitoma anaplásico el 20% (6/30) y glioblastoma multiforme 10% (3/10). Respecto a la localización del tumor, se encontró supratentorial en 33.3% de los casos (10/30), infratentorial 43.3% (13/30) y en el tallo cerebral en 23.3% de los casos (7/30).

En cuanto a la inmunohistoquímica (figura 1), esta investigación se enfrentó a que no había ningún control positivo establecido, por lo que se buscó éste en cáncer de colon, y en riñón sano, ocupándose éste último como control positivo. De la muestra en forma global se encontraron 16 casos negativos y 14 positivos para CD133, la intensidad de la tinción respecto al control positivo fue igual o menor, no hubo ningún caso que rebasará la intensidad del control. Además se notó que las células CD133 positivas tuvieron una tinción citoplasmática y membranal, y que las células positivas no se observaron en aglomerados, sino en forma dispersa.

Se buscó asociación entre diversas variables (Tabla 2 y 3). En cuanto al género y la supervivencia, encontramos que hubo 6 mujeres muertas y 7 hombres al final del estudio ( $p=0.713$ ). Respecto a la histología tumoral y el estado (Gráfica 1), hubo 7 pacientes con tumor de bajo grado muertos (33.3% de los casos de astrocitomas de bajo grado), de astrocitoma anaplásico murieron 4 (66.66% de los casos de astrocitomas anaplásicos) y en cuanto a los pacientes con glioblastoma multiforme 66.6% de los pacientes estuvieron muertos para el final del estudio, en este sentido, al realizar la prueba de Chi cuadrada para determinar asociación entre el estado y la histología tumoral la  $p$  fue de 0.240.

En cuanto a la relación de la edad y el estado (Gráfica 2), se clasificó la muestra en menores de 36 meses y mayores de esta edad. De los menores de 36 meses, todos estuvieron muertos al final del estudio, y en cuanto a los mayores, murió el 37.03% del grupo de esta edad (10 /27 casos) encontramos una  $p=0.70$ .

En cuanto a la expresión de CD133 y el estado encontramos que los casos CD133- murieron 7 pacientes (43.74% de los casos negativos) y de los casos CD133+ murieron 6 pacientes ( 42.85% de los casos CD133+) la  $p= 0.626$ , OR 0.984 (IC 95% 0.526-1.842).

Los astrocitomas de bajo grado fueron principalmente negativos para el marcador CD133 (52% de los casos); los astrocitomas anaplásicos fueron principalmente positivos en la inmunohistoquímica para CD133 (66.6% de los casos) igualmente en el caso de los glioblastomas multiformes (66.6% de los casos) la mitad del grupo de glioblastoma multiforme con CD133+ estuvo muerto para el final del estudio.

La curva de supervivencia (Gráfica 4) muestra una diferencia entre el grupo CD133+ y el grupo CD133- fue de 22.5%, la prueba estadística Log Rank Test mostró una significancia estadística de 0.2749.

Características de la muestra.				
	Mediana	n	%	Rango
Hombres		15	50	
Edad (meses)	78.8			16-192
Menores de 36 meses		3	10	
Vivo		15	56.7	
<b>Histología</b>				
Bajo grado		21	70	
Astrocitoma anaplásico		6	20	
Glioblastoma multiforme		3	10	
<b>Localización tumoral</b>				
Supratentorial		10	33.3	
Infratentorial		13	43.3	
Tallo cerebral		7	23.3	
Expresión CD133+		14	46.7	

Asociación de las variables con el estado	
	<i>p</i>
Género	0.713
Histología	0.240
Edad	0.70



Asociación de las variables con la expresión de CD133			
	<i>p</i>	OR	IC 95%
<b>Sobrevivencia</b>	0.626	0.984	0.526-1,842
<b>Histología</b>	0.623		
<b>Localización tumoral</b>	<b>0.126</b>		

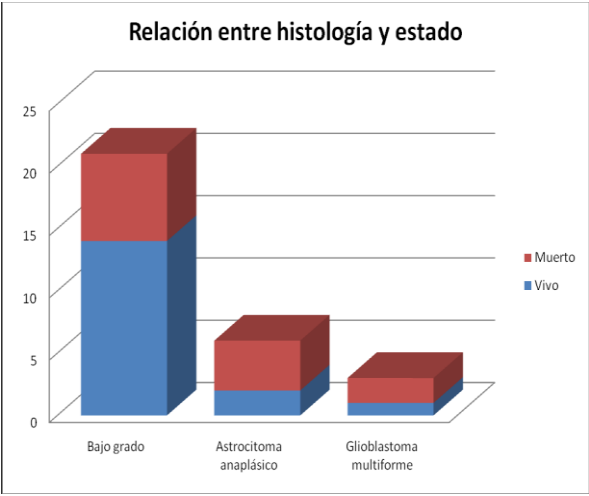


Gráfico 1. Correlación bivariada entre la histología y el estado (vivo/muerto)  $p=0.240$ .

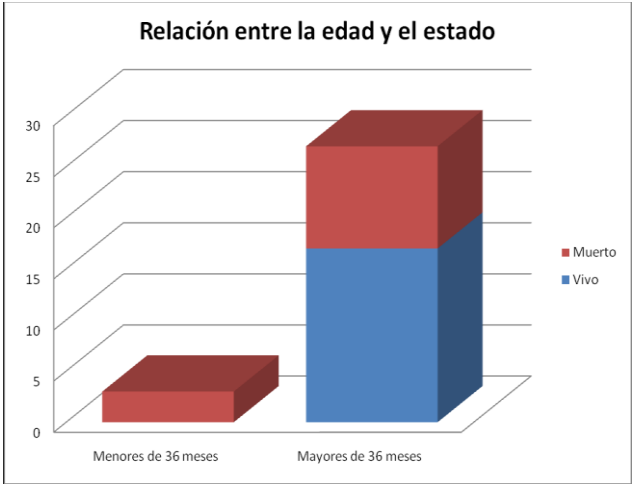
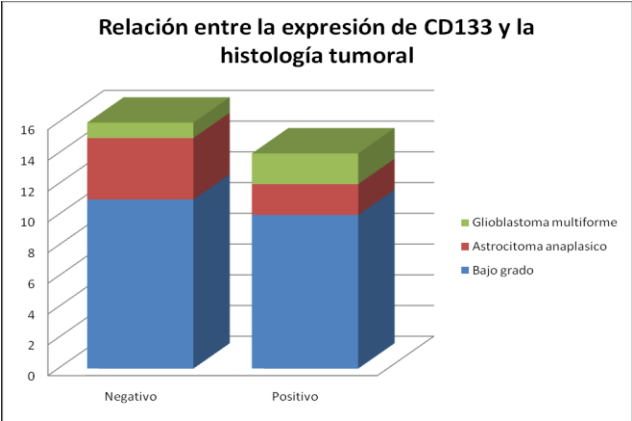
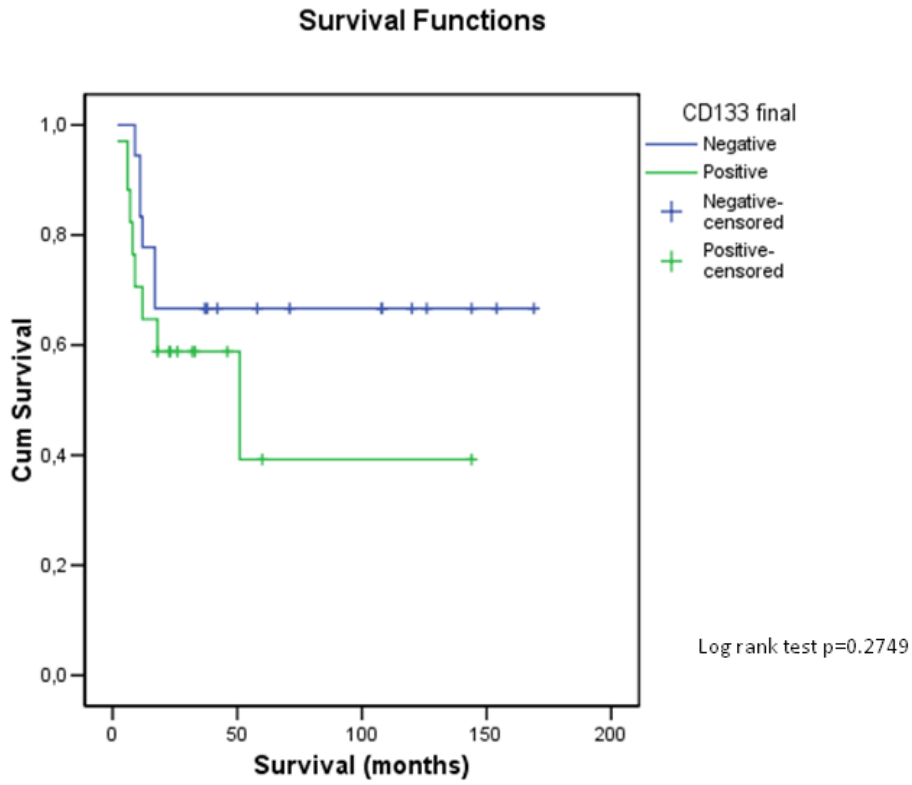


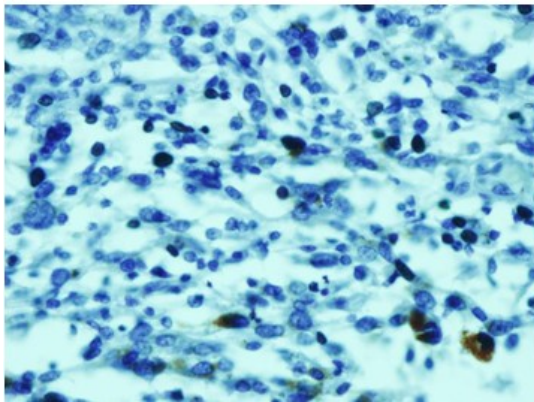
Gráfico 2. Correlación bivariada entre la edad y el estado (vivo/muerto)  $p=0.70$ .



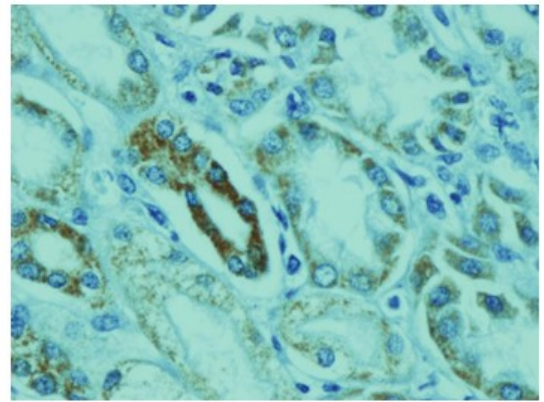
Gráfica 3. Relación entre la expresión de CD133 y la histología tumoral  $p=0.632$ .



Gráfica 4. Supervivencia en función de la expresión de CD133.  $P=0.2749$ .



**Tejido positivo para CD133**



**Control positivo. Riñón**

Figura 1. Fotografía de reacción de inmunohistoquímica positiva para CD133. La intensidad de la tinción de la muestra es menor que el control.

## DISCUSIÓN

Los astrocitomas son cánceres que provocan gran morbimortalidad, las características de la muestra que se estudio coinciden con lo reportado de la epidemiología de estas neoplasias en cuanto a la localización tumoral, histología tumoral y pronóstico para la edad en la población pediátrica<sup>2</sup>.

La molécula CD133, es un marcador de células troncales de cáncer<sup>10</sup>, se ha relacionado positivamente con el pronóstico de varias neoplasias<sup>10,31,34</sup> incluida el glioblastoma multiforme<sup>45</sup>. En varios tumores pediátricos como neuroblastoma la expresión también se relaciona con mal pronóstico<sup>40</sup>.

En este estudio logramos demostrar una diferencia de sobrevida del 22.5% entre los tumores CD133+ y CD133- siendo peor para los primeros, como se observa claramente en la curva de Kaplan Meyer, sin embargo, no se logró significancia estadística del resultado debido a que la muestra es heterogénea en cuanto al tipo histológico (sólo 10% de la muestra fueron glioblastomas multiformes). Por otro lado se demostró que los astrocitomas de alto grado (astrocitoma anaplásico y glioblastoma multiforme) expresan en mayor proporción CD133 (66.6% de los casos) que los astrocitomas de bajo grado (52% de los casos), sin embargo y nuevamente debido a la heterogeneidad de la muestra no se logró establecer significancia estadística, además la función de OR de 0.526 a 1.842 nos hace evidente al tocar la unidad la necesidad de aumentar el tamaño de muestra. Estos resultados descriptivos coinciden con las observaciones realizadas en adultos en el sentido de que entre mayor agresividad tumoral, mayor expresión de células iniciadoras de cáncer<sup>45</sup>, menor supervivencia, y no logramos observar si aquellos tumores de bajo grado con células CD133 positivas degeneraron en progresión tumoral.

Proponemos que el seguimiento de los pacientes que tuvieran astrocitoma de bajo grado con positividad para CD133 deberá ser más prolongada, con el fin de determinar el pronóstico de estos tumores, pues es posible que éstos al contener células troncales de cáncer puedan devenir posteriormente en glioblastomas secundarios como se había notado en los experimentos *in vitro*<sup>10</sup> y las observación *in vivo*<sup>45</sup>.

Existen mecanismos muy conservados tanto en el desarrollo de órganos, la homeostasis y la tumorigénesis. Es muy probable que los gliomas se originen de células primitivas dentro de la jerarquía de la génesis glial posnatal. Estas células primitivas son susceptibles de transformación oncogénica. Los estudios con esferas constituidas de células formadoras de gliomas son capaces de diferenciarse hacia diversos linajes. Además, la cantidad de células dentro de un tumor que son capaces de desencadenar cáncer son una minoría, las CD133+, bajo este enfoque, es probable que no siempre se logren observar con la técnica de inmunohistoquímica aún cuando sí existan dentro de la masa tumoral.<sup>45</sup> por lo tanto proponemos que se empleen técnicas que logren identificar las células CD133+ (la minoría dentro de la masa tumoral) con otras técnicas más sensibles como la citometría de flujo, como se ha hecho para otras neoplasias.

El marcador CD133 se correlaciona en diversos estudios con angiogénesis, que es un fenómeno indispensable para la supervivencia de un tumor, pues de allí depende su nutrición<sup>13</sup>. Estudios de

cánceres que dependen de la angiogénesis para determinar su pronóstico como el mieloma múltiple<sup>34</sup>, han demostrado que la molécula prominin es un marcador de células endoteliales madre<sup>27</sup>, y no sólo eso, la agrupación de las células CD133+ alrededor de vasos otorga un peor pronóstico para los glioblastomas<sup>45</sup>. Por lo tanto se hace obligatorio que a los tumores con expresión positiva para CD133 se les otorguen esquemas terapéuticos más agresivos.

Conocer las vías moleculares que subyacen al cáncer ha logrado que se construyan moléculas dirigidas a blancos terapéuticos muy específicos, como el caso de la leucemia mieloide crónica en los adultos, y que se mejore en forma ostensible el pronóstico de los pacientes. Este tipo de estudios constituyen la primera aproximación al comportamiento biológico de un tumor y son indispensables para determinar hacia dónde se dirigirán los esfuerzos de la investigación básica y clínica dentro de los siguientes años. Nuestra investigación es la primera en reportar la expresión de CD133 en astrocitomas de pacientes pediátricos, lo que constituye un avance importante en el progreso de la oncología pediátrica.

El cáncer del sistema nervioso central tiene un gran impacto en la morbimortalidad de aquellos que lo padecen y es indispensable, dada la incidencia de esta patología, orientar más esfuerzos económicos y humanos a su conocimiento<sup>1</sup>.

## CONCLUSIONES

1. Existe una diferencia de la supervivencia de pacientes con astrocitomas CD133+ respecto a los CD133 negativos de 22.5%, pero no se observó significancia estadística de esta observación.
2. La molécula prominin-1 se expresa más en tumores con histología de alto grado que de bajo grado, pero no hay significancia estadística de esta observación.
3. A pesar de que no existe significancia estadística en cuanto a la sobrevida, es importante considerar la positividad de CD133 para un tratamiento más intenso con antiangiogénicos (como nimotuzimab y bevacizumab).

## BIBLIOGRAFÍA

1. Fajardo-Gutierrez A, Mejía-Aranguré J, Hernández-Cruz L, et al. Epidemiología descriptiva de las neoplasias malignas en niños. *Rev Panam Salud Publica* . 1999;6(2):75.
2. López-Aguilar E, Sepúlveda-Vildósola AC, Rivera-Márquez H, et al. Preirradiation ifosfamide, carboplatin and etoposide (ICE) for the treatment of high-grade astrocytomas in children. *Childs Nerv Syst*. 2003;19(12):818-23.
3. Agulnik M, Mason WP. The changing management of low-grade astrocytomas and oligodendrogliomas. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2006;20(6):1249-66.
4. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. 2007;114(2):97-109.
5. López-Aguilar E, Sepúlveda-Vildósola AC, Betanzos-Cabrera Y, et al. Phase II study of metronomic chemotherapy with thalidomide, carboplatin-vincristine-fluvastatin in the treatment of brain stem tumors in children. *Arch Med Res*. 2008;39(7):655-62.
6. Packer RJ, MacDonald T, Vezina G. Central nervous system tumors. *Pediatr Clin North Am*. 2008;55(1):121-45, xi.
7. Rivera-Luna R, Zapata-Tarrés M, Medina-Sansón A, et al. Long-term survival in children under 3 years of age with low-grade astrocytoma. *Childs Nerv Syst*. 2007;23(5):543-7.
8. Faury D, Nantel A, Dunn SE, et al. Molecular profiling identifies prognostic subgroups of pediatric glioblastoma and shows increased YB-1 expression in tumors. *J Clin Oncol*. 2007;25(10):1196-208.
9. López-Aguilar E, Sepúlveda-Vildósola AC, Rivera-Márquez H, et al. Clinical and molecular parameters for risk stratification in Mexican children with medulloblastoma. *Arch Med Res*. 2007;38(7):769-73.
10. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 2004;432(7015):396-401.
11. Bao S, Wu Q, McLendon RE, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 2006;444(7120):756-60.
12. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001;414(6859):105-11.
13. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
14. Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, et al. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood*. 1997;90(12):5013-21.
15. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 1997;90(12):5002-12.
16. Weigmann A, Corbeil D, Hellwig A, Huttner WB. Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(23):12425-30.
17. Salven P, Mustjoki S, Alitalo R, Alitalo K, Rafii S. VEGFR-3 and CD133 identify a population of CD34+ lymphatic/vascular endothelial precursor cells. *Blood*. 2003;101(1):168-72.
18. Uchida N, Buck DW, He D, et al. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(26):14720-5.
19. Lee A, Kessler JD, Read T, et al. Isolation of neural stem cells from the postnatal cerebellum. *Nat Neurosci*. 2005;8(6):723-9.
20. Sagrinati C, Netti GS, Mazzinghi B, et al. Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(9):2443-56.

21. Richardson GD, Robson CN, Lang SH, et al. CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 16):3539-45.
22. Kordes C, Sawitza I, Müller-Marbach A, et al. CD133+ hepatic stellate cells are progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;352(2):410-7.
23. Oshima Y, Suzuki A, Kawashimo K, et al. Isolation of mouse pancreatic ductal progenitor cells expressing CD133 and c-Met by flow cytometric cell sorting. *Gastroenterology.* 2007;132(2):720-32.
24. Sugiyama T, Rodriguez RT, McLean GW, Kim SK. Conserved markers of fetal pancreatic epithelium permit prospective isolation of islet progenitor cells by FACS. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(1):175-80.
25. Ito Y, Hamazaki TS, Ohnuma K, et al. Isolation of murine hair-inducing cells using the cell surface marker prominin-1/CD133. *J Invest Dermatol.* 2007;127(5):1052-60.
26. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood.* 2000;95(3):952-8.
27. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res.* 1999;85(3):221-8.
28. Spring H, Schüler T, Arnold B, Hämmerling GJ, Ganss R. Chemokines direct endothelial progenitors into tumor neovessels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(50):18111-6.
29. Dome B, Timar J, Dobos J, et al. Identification and clinical significance of circulating endothelial progenitor cells in human non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2006;66(14):7341-7.
30. Fürstenberger G, von Moos R, Senn H, Boneberg E. Real-time PCR of CD146 mRNA in peripheral blood enables the relative quantification of circulating endothelial cells and is an indicator of angiogenesis. *Br J Cancer.* 2005;93(7):793-8.
31. Lin EH, Hassan M, Li Y, et al. Elevated circulating endothelial progenitor marker CD133 messenger RNA levels predict colon cancer recurrence. *Cancer.* 2007;110(3):534-42.
32. Mehra N, Penning M, Maas J, et al. Progenitor marker CD133 mRNA is elevated in peripheral blood of cancer patients with bone metastases. *Clin Cancer Res.* 2006;12(16):4859-66.
33. Cortelezzi A, Fracchiolla NS, Mazzeo LM, et al. Endothelial precursors and mature endothelial cells are increased in the peripheral blood of myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma.* 2005;46(9):1345-51.
34. Zhang H, Vakil V, Braunstein M, et al. Circulating endothelial progenitor cells in multiple myeloma: implications and significance. *Blood.* 2005;105(8):3286-94.
35. Yu Y, Flint AF, Mulliken JB, Wu JK, Bischoff J. Endothelial progenitor cells in infantile hemangioma. *Blood.* 2004;103(4):1373-5.
36. Bruno S, Bussolati B, Grange C, et al. CD133+ renal progenitor cells contribute to tumor angiogenesis. *Am J Pathol.* 2006;169(6):2223-35.
37. Horst D, Kriegl L, Engel J, Kirchner T, Jung A. CD133 expression is an independent prognostic marker for low survival in colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2008;99(8):1285-9.
38. Kojima M, Ishii G, Atsumi N, et al. Immunohistochemical detection of CD133 expression in colorectal cancer: a clinicopathological study. *Cancer Sci.* 2008;99(8):1578-83.
39. Shmelkov SV, Butler JM, Hooper AT, et al. CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J Clin Invest.* 2008;118(6):2111-20.
40. Tong Q, Zheng L, Tang S, et al. Expression and clinical significance of stem cell marker CD133 in human neuroblastoma. *World J Pediatr.* 2008;4(1):58-62.
41. Beier D, Wischhusen J, Dietmaier W, et al. CD133 expression and cancer stem cells predict prognosis in high-grade oligodendroglial tumors. *Brain Pathol.* 2008;18(3):370-7.

42. Maeda S, Shintchi H, Kurahara H, et al. CD133 expression is correlated with lymph node metastasis and vascular endothelial growth factor-C expression in pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2008;98(8):1389-97.
43. Klein WM, Wu BP, Zhao S, et al. Increased expression of stem cell markers in malignant melanoma. *Mod Pathol*. 2007;20(1):102-7.
44. Chiou S, Kao C, Chen Y, et al. Identification of CD133-positive radioresistant cells in atypical teratoid/rhabdoid tumor. *PLoS ONE*. 2008;3(5):e2090.
45. Zeppernick F, Ahmadi R, Campos B, et al. Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. *Clin Cancer Res*. 2008;14(1):123-9.



## **ANEXO**

### *Tratamiento y seguimiento de los pacientes.*

Posterior a la cirugía, cada paciente recibió el primer ciclo de quimioterapia con carboplatino (400mg /m<sup>2</sup>/día en el día 1, diluido en solución salina 0.9% que se administrará durante una hora) ifosfamida (2g/m<sup>2</sup>/día en los días 1, 2 y 3, diluido en solución salina 0.9% que se administró por una hora), y etopósido (100mg/m<sup>2</sup>/día en los días 1, 2, y 3 diluido en solución salina al 0.9% que se administró por una hora) en cursos de cada 4 semanas por cuatro cursos. Cada paciente recibió antieméticos (ondansetron 8 mg /m<sup>2</sup> por dosis cada 8 h) simultáneo con la QT y 24 h después de haberse completado el ciclo, hiperhidratación (3000mL/m<sup>2</sup>/día de dextrosa 5% 2:1 salina normal) y protector de mucosa vesical (MESNA 100% de la dosis de ifosfamida cada 6 h en días 1, 2, y 3).

Se dio seguimiento a 28 días de haber completado el cuarto ciclo de quimioterapia y se sometieron a radioterapia hiperfraccionada con dosis total de 54cGy, en dos fracciones de 1.1cGy por día por 25 días. Posteriormente se administraron cuatro ciclos más del mismo régimen de quimioterapia.

Los estudios de seguimiento incluyeron resonancia magnética luego del segundo y cuarto curso de quimioterapia, y 4 semanas después de haber completado radioterapia se evaluó la toxicidad con exámenes de función renal y biometría hemática luego de cada curso.