



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD  
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI  
HOSPITAL DE PEDIATRÍA**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE  
MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**“ASOCIACIÓN DE LA SOBREEXPRESIÓN DE AKT CON EL PRONÓSTICO DE  
PACIENTES CON MEDULOBLASTOMAS EN EDAD PEDIÁTRICA”**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN PEDIATRIA MÉDICA PRESENTA:**

**DRA. ANAYANTZIN BOEHLER REYES**

Tutor de tesis:

**DR. JAVIER ENRIQUE LÓPEZ AGUILAR**

**MÉDICO ONCÓLOGO PEDIATRA ADSCRITO AL SERVICIO DE ONCOLOGÍA  
HOSPITAL PEDIATRÍA CMN SXXI**

**ASESOR METODOLÓGICO:**

**- DRA. ANA CAROLINA SEPÚLVEDA VILDÓSOLA**  
Jefe de Educación e Investigación en Salud del HP CMN SXXI

**COLABORADORES:**

**- DRA. GEORGINA SIORDIA REYES**  
Médico Adscrito al Servicio de Anatomopatología HP CMN SXXI  
**- Q. F. B. ANA LETICIA FIGUEROA ROSAS**  
Químico Adscrito al Laboratorio de Investigación en Tumores

**MÉXICO, D.F.  
JULIO 2010**



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.

# ÍNDICE

	PÁGINA
RESUMEN ESTRUCTURADO.....	2
ANTECEDENTES.....	3
JUSTIFICACIÓN.....	18
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	18
HIPÓTESIS.....	19
OBJETIVO.....	19
MATERIAL Y MÉTODOS.....	19
RESULTADOS.....	24
DISCUSIÓN.....	30
BIBLIOGRAFÍA.....	32
ANEXO.....	36

# ASOCIACIÓN DE LA SOBREENPRESIÓN DE AKT CON EL PRONÓSTICO DE PACIENTES CON MEDULOBLASTOMAS EN EDAD PEDIÁTRICA

## RESUMEN

**AUTORES:** A Boehler Reyes, E López Aguilar, C Sepúlveda Vildósola, G Siordia Reyes, L Figueroa Rosas.

**INTRODUCCIÓN:** Los factores clínicos, histológicos y moleculares han sido descritos como importantes en la supervivencia de los pacientes con meduloblastoma. El AKT es un marcador asociado al pronóstico y grado de malignidad, sin embargo en la población pediátrica con meduloblastoma no se ha establecido su sobreexpresión ni asociación con la sobrevida de éstos pacientes.

**OBJETIVO:** Determinar si existe asociación entre la sobreexpresión de la proteína AKT y el pronóstico de los pacientes pediátricos con meduloblastoma.

**LUGAR:** Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional SXXI, Unidad Médica de Alta Especialidad.

**MATERIAL Y MÉTODOS:** Se realizó un estudio de cohorte, retrospectivo, observacional, longitudinal. Se incluyeron todos los pacientes diagnosticados con meduloblastoma de Enero de 1995 a Diciembre de 2008. Se revizaron los expedientes clínicos y se realizó en las muestras de tejido de meduloblastoma estudio de inmunohistoquímica; se evaluó la sobreexpresión de AKT. El análisis que se realizó fué prueba exacta de Fischer y curvas de sobrevida y se probó la diferencia entre los grupos con la prueba de Log Rank y OR para determinar el riesgo de morir.

**RESULTADOS:** Se incluyeron 21 pacientes, 16 fueron masculinos (76.2%) y femeninos (23.8%), con mediana para edad de 72 meses con un rango de 12-180 meses. Por su tipo histológico, 10 pacientes (47.6%) tuvieron tumoración que variedad clásica, 7 (33.33%) desmoplásicos y 4 (19.04%) anaplásicos. En cuanto al AKT 5 pacientes (23.8%) fueron positivos para su sobreexpresión y 16 (76.2%) negativos. La sobrevida teniendo sobreexpresión de AKT fue del 75% (media = 80) a 18 meses, 34% a 60 meses y 18.7% a 120 meses, teniendo AKT negativo, la sobrevida fué del 38.8% a 18 meses (mediana = 40)  $p=0.258$ . De la variedad anaplásica 2 (50%) fueron positivos para AKT; y los otros 3 correspondieron a histologías clásicas. De los 7 tumores variedad desmoplásico, ninguno sobreexpresó AKT ( $p=0.141$ ). No se encontró asociación y riesgo de muerte con la histología. Del grupo evaluado 13 (61.9%) recibieron quimioterapia con ifosfamida, carboplatino y etopósido (ICE) y 8 (38.1%) recibieron sólo doble droga con carboplatino y etopósido ( $p=0.166$  OR=0.49).

**CONCLUSIONES:** Los parámetros clínicos usados para estadificación de riesgo, no son completamente satisfactorios en predecir la respuesta a la terapia. A pesar de no encontrar una asociación de mayor riesgo en aquellos pacientes con meduloblastoma que sobreexpresan AKT, hay que considerar que el tamaño de muestra fue pequeño y sí parece existir una asociación entre la sobreexpresión de AKT con sus variedades histológicas más agresivas y la asociación de meduloblastoma desmoplásico al no sobreexpresar AKT es de buen pronóstico. El esquema de tratamiento utilizado fué un factor pronóstico importante.

# ANTECEDENTES

## EPIDEMIOLOGÍA

A nivel mundial se considera que la incidencia del cáncer se encuentra entre 100 y 182 casos por millón por año existiendo diferentes patrones de presentación, siendo más frecuente en los hombres, en la raza blanca, en los menores de 5 años de edad y aparentemente en el medio urbano. Casi el 20% de los tumores infantiles suceden en lactantes y niños menores de 3 años de edad (1).

El cáncer en los niños en México es en la actualidad uno de los problemas más importantes de salud pública, la tasa de incidencia del cáncer en edad pediátrica es del orden de 136 casos por millón por año, ocupando la segunda causa de morbilidad en la población pediátrica (2).

Su frecuencia se ha incrementado en un 8.5% en la última década. En lo referente a los diferentes grupos de neoplasias, en forma específica, hubo incremento para las leucemias, los tumores del sistema nervioso central, retinoblastoma, tumores hepáticos y tumores de células germinales (3).

En cuanto a las causas más frecuentes de cáncer en la edad pediátrica, Rivera Luna reporta en 1996 que en México los tumores del sistema nervioso central ocupaban el cuarto lugar de todas las neoplasias malignas, con una incidencia de 2.5 casos por 100 mil niños menores de 15 años al año. Lo cual difiere con lo reportado por Fajardo en su estudio realizado en los Hospitales más importantes del DF y la frecuencia reportada en los E.U.A, donde los tumores del sistema nervioso central ocupan el segundo lugar de las neoplasias malignas (cuadro 1); esto no ha variado de acuerdo a lo reportado por Fajardo, et al. en el 2007 en su estudio realizado en diez jurisdicciones de la República Mexicana; presentándose éstos en menores de 1 años de edad con una incidencia del 10.6% y en menores de 5 años llegando al 18.2% (4). La mayor incidencia es para las leucemias, seguidas del linfoma, y posteriormente los tumores cerebrales. Se estima que anualmente ocurren 17 casos por millón en menores de 15 años, lo que significa aproximadamente 560 nuevos casos por año (2).

La frecuencia de presentación de los tumores cerebrales es del 12% con una tasa de incidencia de 17 por millón, con evidencia clara de tendencia al incremento y, de acuerdo a la tasa mencionada, en México debieran diagnosticarse aproximadamente 1,700 casos de tumores de SNC por año, pero con la evidencia de frecuencia de detección es mucho más baja, de tal forma que los casos que se están atendiendo son menores al número real de casos.

**CUADRO 1. FRECUENCIA RELATIVA DE NEOPLASIAS MALIGNAS EN MENORES DE 15 AÑOS DE EDAD EN TRES ESTUDIOS DIFERENTES**

<b>DIAGNOSTICO</b>	<b>INP<sub>1</sub></b>	<b>MULTICENTRICO<sub>2</sub></b>	<b>E.U.A.<sub>3</sub></b>
<b>Leucemia</b>	35%	34.4%	30%
<b>Linfomas</b>	16%	19.5%	13%
<b>Retinoblastoma</b>	12%	8.5 %	3%
<b>SNC</b>	10%	10%	19%
<b>Tumores óseos</b>	6%	6.5%	5%
<b>Tumores Renales</b>	5%	5.6%	6%
<b>Tumore germinal.</b>	3%	5.1%	----
<b>Sarcoma de Tejidos Blandos</b>	3%	4.8%	7%
<b>Neuroblastoma</b>	2%	2.7%	8%
<b>Otros</b>	8%	3%	9%

SNC: Sistema Nerviosos Central. I.N.P: Instituto Nacional de Pediatría. E.U.A.: Estados Unidos de Norteamérica.

1.- Rivera L, et al. Bol Med Hosp Infant. mex 1996; 53:598-605.

2.- Fajardo-Gutierrez A, et al. Bol Hosp Infant Mex 1996; 53: 57-66.

3.- Linet MS, et al. J Natl Cancer Inst 1999; 91:1051-57.

## **ETIOPATOGENIA DEL MEDULOBLASTOMA**

Los tumores de origen embrionario están comprendidos en diversos subtipos, de los cuales, los tumores malignos del SNC son los más comunes en pediatría, la biología de éstos tumores depende del tipo histológico; el mas conocido es el meduloblastoma (5).

El meduloblastoma es el segundo tumor cerebral más frecuente en pediatría después del astrocitoma. La histogénesis de este tumor ha sido controversial durante varios años. Algunos autores apoyan el origen primario de las células neuroectodérmicas primitivas en la matriz germinal que rodea los ventrículos. De acuerdo con otro estudio, el meduloblastoma expresa el gen *ZIC1*, identificado en la zona granular del cerebelo, lo cual sugiere que éste tumor se origina de las células precursoras de la capa granular externa, tal es el caso de la variedad nodular el cual se origina de la capa granular externa y la variedad clásica, cuyo origen es en la matriz subventricular (7, 8).

Es un tumor sumamente invasivo; el 18% de los niños con tumores cerebrales se presenta entre 1-5 años de edad y el 12% en niños menores de 6 meses de edad presenta meduloblastoma (4). Sin embargo, la media de presentación de los meduloblastomas es de 5 a 7 años (6). En 1 a 2% de los pacientes, el meduloblastoma se asocia con el Síndrome de Gorlin el cual es un desorden autosómico dominante caracterizado por una predisposición a desarrollar carcinomas basocelulares, queratoquistes múltiples en los maxilares, fibromas ováricos y meduloblastoma. De igual manera, en un 40% de los casos existe una asociación con el Síndrome de Turcot donde existe poliposis colónica (7, 8).

## **MECANISMOS DE TRANSDUCCION QUE PROMUEVEN LA ONCOGENESIS**

**Shh (Sonic hedgehog):** Es una proteína miembro de una familia de señalización cuya función es promover las señales de transducción para el desarrollo cerebelar normal. Se encuentra regulado negativamente por su receptor (PTCH 1). Las mutaciones del gen que inactiva el receptor PTCH1 en el cromosoma 22, incrementa en un 10-30% el riesgo de desarrollar meduloblastoma.

**Wingless (Wnt):** Es una familia de receptores de factores de crecimiento que se encuentran involucrados en la embriogénesis y actúan a través de la regulación de la transcripción de genes que controlan el ciclo celular incluyendo como *MYC*, *NMYC*, y *ciclina D*. Un 20% de los

meduloblastomas existe alteraciones en esta vía; la sobreexpresión de *MYC* se asocia con una menor supervivencia y la sobreexpresión de *MYC* causa anaplasia en meduloblastoma. La  $\beta$ -Catenina, un factor nuclear de la transcripción en la vía de Wnt se asocia con una mejor respuesta y sobrevida probablemente a través de algún mecanismo antiapoptótico.

**Receptor de la tirosina cinasa:** Son 4 miembros de esta familia: receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor de factor de crecimiento plaquetario (PDGFR), receptor de factor de crecimiento de nervio (NGFR), y receptor de neurotrofina-3 (TrkC) los cuales se encuentran asociados con meduloblastoma. EGFR es una parte de la familia de ErbB1–ErbB4, y el ErbB2 (HER2/Neu) es el que está hasta en un 84% expresado en meduloblastomas. PDGFR $\beta$ , incluye a la vía de Ras/MAPK, la cual regula las metástasis en meduloblastomas. La sobreexpresión de TrkC es de pronóstico favorable en el meduloblastoma, al regular la proliferación de las células cerebelosas en la zona granular mediante apoptosis. La AKT/proteína cinasa B representa un mediador en la señal de transducción de vías de control del crecimiento que involucran el fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K). El fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato actúa como un potente segundo mensajero reclutando AKT/proteína cinasa B a la membrana plasmática donde se activa por fosforilación y subsecuentemente fosforila diversos efectores controladores del crecimiento. El nivel intracelular de fosfatidil inositol-3,4,5-trifosfato se regula por PTEN/MMAC. PTEN representa un gen supresor en meduloblastoma, la pérdida de la función de PTEN contribuye a la hiperfunción de la vía PI3K/AKT. (9,10,11,12).

**Retinoides.** Inducen la apoptosis en meduloblastomas. Los derivados del ácido retinoico se usan actualmente en ensayos clínicos para pacientes de alto riesgo con meduloblastoma (12).

**Notch/CXCR4.** Los ligandos Notch, se unen a uno de sus cuatro receptores (Notch1–4) que conducen la división y translocación celular. Notch2 se detecta en células progenitoras proliferantes en el meduloblastoma, asociándose con un pronóstico peor. CXCR4, es un receptor de quimiocinas importante en el cerebelo en desarrollo. Tiene un efecto en la proliferación celular, quimiotaxis y efectos antiapoptóticos a través de la regulación de la cantidad de AMPc (12).



**Proteínas inhibidoras de la apoptosis.** Una familia de proteínas inhibidores de la apoptosis ha sido investigada por su regulación al alza en diversas neoplasias, tal es el caso de la Survivina, un inhibidor de la apoptosis, que está altamente expresada durante la neurogénesis, está sobreexpresado en el meduloblastoma y se considera su de mal pronóstico en éste tumor (12).

## CUADRO CLÍNICO

Los pacientes con meduloblastoma presentan signos de hipertensión intracraneal, cefalea con vómitos, irritabilidad y letargo. Debido a que muchos meduloblastomas pediátrica surgen en la línea media del cerebelo, puede haber inestabilidad axial, que se manifiesta como una marcha atáxica. Una característica típica del meduloblastoma visto con TAC es una masa en la zona vermiana cerebelosa, homogénea, que se intensifica con el contraste. En la imagen de resonancia magnética se observa una masa heterogénea hipointensa en las secuencias de T1 y en las secuencias T2 los meduloblastomas son intermedios entre la materia gris y blanca, que es una característica que distingue éste tipo de tumor con respecto a los demás tumores del SNC que muestran hiperintensidad en T2 en comparación con la materia gris. Las metástasis son raras, pero cuando ocurren, su destino es en la médula ósea (12, 13, 14, 15).

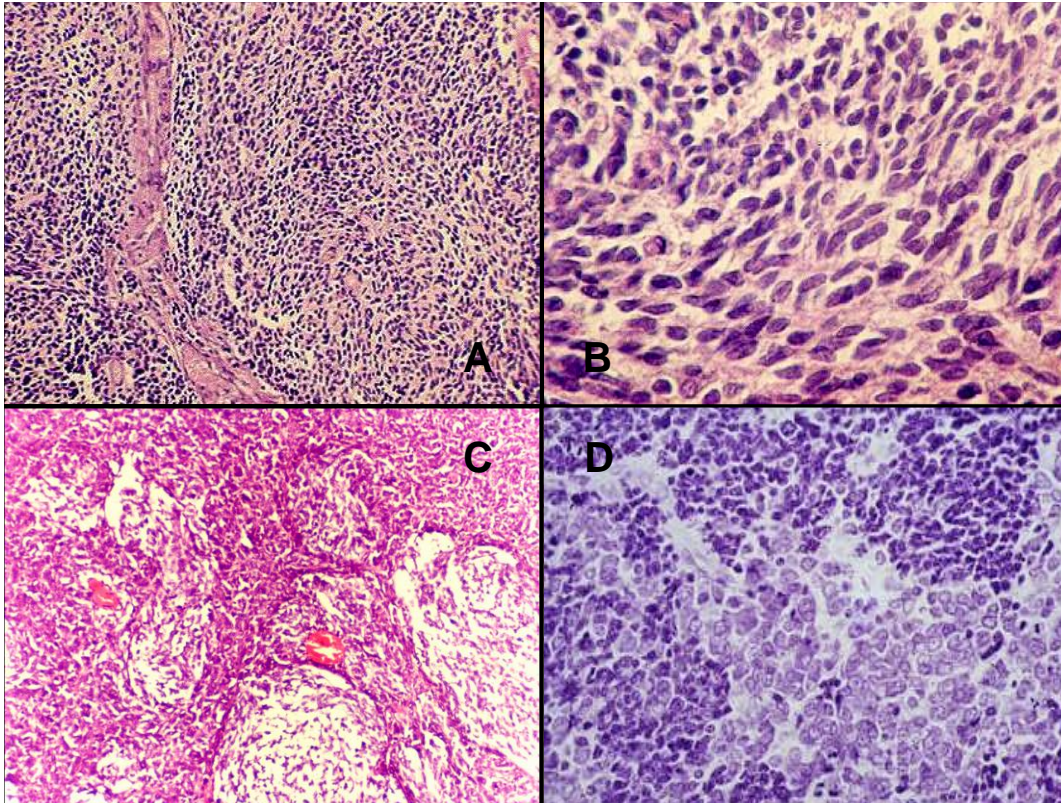
El tratamiento óptimo para el meduloblastoma incluye la resección quirúrgica máxima del tumor, radioterapia al tumor y neuroeje y quimioterapia sistémica. Los pacientes que tienen una resección parcial o total del meduloblastoma no metastásico tienen un mejor pronóstico que los de biopsia, seguidos de radioterapia ya que la sobrevida a 5 años es de un 78% contra una 43%. La radioterapia es un componente del manejo inicial del meduloblastoma pero debido a su toxicidad sobre SNC se evita en algunas ocasiones, puede causar retardo de crecimiento, insuficiencia adrenal e hipogonadismo (7,16).

## CLASIFICACIÓN

Actualmente la Organización Mundial de la Salud utiliza una escala de grados en función de la conducta biológica de las neoplasias del sistema nervioso para clasificarlas, donde los meduloblastomas se consideran como Grado IV debido a su proliferación microvascular y/o necrosis (17).

De acuerdo a su morfología histológica existen cinco tipos de meduloblastoma. Figura 1:

- I. Meduloblastoma Desmoplásico-nodular; morfológicamente se caracteriza por presentar abundante estroma y apariencia nodular.
- II. Meduloblastoma clásico es un tumor altamente celular, friable, compuesto de células con núcleo intensamente basofílico, de tamaños y formas variables, con citoplasma relativamente escaso y con abundantes mitosis.
- III. Meduloblastoma anaplásico; caracterizada por células grandes con núcleos grandes redondos, nucleolo prominente, mitosis y apoptosis abundantes y con pleomorfismo nuclear. Estos tumores son positivos para sinaptofisina y cromogranina.
- IV. Meduloblastoma melanocítico; Es un tumor que se caracteriza por la acumulación de células tumorales melanocíticas.
- V. Medulomioblastomas; Se caracteriza por presentar áreas de diferenciación miogénica. Al igual que el anterior este tipo de tumor es muy raro (17).



**FIGURA 1:** Microfotografías en las que se muestra las diferentes variedades de meduloblastoma; A y B: Clásico, C: Desmoplásico y D: Anaplásico

En cuanto a la clasificación de Chang para meduloblastoma de acuerdo a su localización anatómica, se tiene (18):

- a) T1 Tumor de < 3 cm. de diámetro y limitada a la porción media del vermis, el techo del cuarto ventrículo y menos frecuente los hemisferios cerebelosos.
- b) T2 Tumor de > de 3 cm. de diámetro, invadiendo una estructura adyacente o parcialmente ocupando el cuarto ventrículo.
- c) T3:
  - \* T3a Tumor que invade dos estructuras adyacentes o que ocupan completamente el cuarto ventrículo con extensión hacia el acueducto de Silvio, foramen de Magendie o el foramen de Luscka, produciendo hidrocefalia acentuada.

\* T3b Tumor que se origina del piso del cuarto ventrículo o del puente y que ocupa el cuarto ventrículo.

d) T4 Tumor que se extiende a través del acueducto de Silvio para involucrar el tercer ventrículo o que se extiende a la porción superior del cordón cervical.

M0: No hay metástasis.

M1: Células microscópicas tumorales en LCR.

M2: Implantación en cerebelo, espacio subaracnoideo o entre tercer y cuarto ventrículo.

M3: Implantación subaracnoidea nodular.

M4: Metástasis extraneural.

## **FACTORES PRONÓSTICOS**

Básicamente son las siguientes características; entre los factores de mal pronóstico del meduloblastoma se refiere edad al diagnóstico menor de tres años, el tamaño o volumen del tumor residual; por su histología, se refiere a la variedad anaplásica. Existe la necesidad del conocimiento del comportamiento biológico distintivo de los meduloblastomas, por lo que han surgido varios marcadores moleculares que correlacionan con el pronóstico y respuesta al tratamiento, se ha asociado con un mal pronóstico la sobreexpresión de Ki-67/MIB-1, ERBB2, pérdida de la heterocigocidad de 17p, amplificación de MYCC; en cuanto a un pronóstico favorable se refiere sobreexpresión de TrkC.

De acuerdo al estudio de North American Children's Oncology Group, se establecieron dos variedades pronósticas (19, 23):

- **BAJO RIESGO:** Niños mayores de tres años de edad con tumor localizado en la fosa posterior; que haya sido extirpado totalmente o casi totalmente ( $<1.5 \text{ cm}^3$  de tumor residual) y que no haya diseminación. A éste grupo pertenece el 65% de los casos.
- **ALTO RIESGO:** Niños menores de tres años de edad o con enfermedad metastásica, resección subtotal ( $>1.5 \text{ cm}^3$  de tumor residual), localización fuera de la fosa posterior y variedad histopatológica de meduloblastoma anaplásico.

El Grado de la OMS es un componente de una combinación de criterios utilizados para inferir la respuesta al tratamiento y supervivencia. Otro criterio incluye los hallazgos clínicos, tales como la edad del paciente, estado de actividad neurológica y la localización del tumor; características radiológicas como el realce de contraste, grado de la resección quirúrgica; índices de proliferación y alteraciones genéticas.

El pronóstico de los pacientes con tumores grado IV de la OMS, como es el caso de los Meduloblastomas, depende en gran medida de que los regímenes de tratamiento efectivo están disponibles. Los meduloblastomas, son rápidamente fatales si no se tratan, mientras que la supervivencia posterior a la radioterapia y/o quimioterapia se ha estimado hasta en un 60% (17). 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 (19, 20,).

Las células troncales requieren para ser cancerosas: evadir la apoptosis, ser autosuficientes en señales de crecimiento, ser insensibles a señales que limitan crecimiento, promover angiogénesis sostenida, tener potencial replicativo ilimitado, tener capacidad de invasión tisular y metástasis (21, 22, 23, 24).

## **CITOGENÉTICA DEL MEDULOBLASTOMA**

Los estudios citogenéticos y los estudios de hibridación comparativa genómica (CHG) han identificado diversas aberraciones en los meduloblastomas, una de ellas es que el locus del meduloblastoma se ha identificado en el cromosoma 17p. El análisis citogenético de los meduloblastomas revela en un 30-50% la pérdida de material genético a nivel del brazo corto (p) del cromosoma 17, lo cual, es la característica más común del meduloblastoma, actualmente se ha identificado como isocromosoma 17p, tal hallazgo predice una respuesta clínica al tratamiento desfavorable. Así mismo, una deleción puede ser observada en el 17p13.1-p12, la misma región cromosomal, donde la pérdida de los alelos se ha observado en los tipos de cáncer de colon, y en la misma región donde el gen p53 ha sido identificado. (13,25).

Estudiando las bases moleculares de las metástasis en los meduloblastomas, MacDonald et al obtuvo la expresión del perfil de 23 meduloblastomas primarios clínicamente designados como metastásicos y no metastásicos, e identificó 85 genes, cuya expresión difiere significativamente entre los tipos de meduloblastoma. Ellos evidenciaron que el receptor alfa del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFR $\alpha$ ), y miembros del downstream Ras, al ser activadas por la vía de señalización de la proteína quinasa (MAPK), tienen regulación positiva en los tumores metastásicos. La inmunohistoquímica mostró sobreexpresión significativa de PDGFR $\alpha$  en tumores metastásicos en comparación con los tumores no metastásicos (8).

En otros estudios, Gilbertson y Clifford identificaron que el PDGFR $\beta$  también se encuentra regulado en las formas invasivas del meduloblastoma; se expresa preferentemente en el meduloblastoma metastásico. Sugieren que podría ser útil como marcador pronóstico y como una diana terapéutica para la enfermedad (26).

Por otra parte, se ha demostrado que el gen de *Drosophila* Cic (CIC) regula la activación de c-ErbB (EGFR) a través de la vía de señalización de represión transcripcional. La expresión de CIC y los altos niveles de ErbB2 y ErbB4 correlaciona con mal pronóstico en los meduloblastomas (27).

El análisis genético ha revelado varios marcadores en el meduloblastoma tales como MYC, ERBB2 y NTRK3 (TRKC), cuya expresión puede dar un pronóstico de la enfermedad. La amplificación de MYC ocurre en un 5-10% de los casos, y la expresión del RNA de MYC ha sido asociada con un pobre pronóstico (28, 29). En el ensayo realizado por Haas et al., mostró que la expresión combinada de tres genes es capaz de pronosticar la supervivencia de los pacientes con meduloblastoma; en los pacientes donde no expresaron MYC existe un resultado muy bueno. En contraste, la sobreexpresión concomitante de LDHB y la CCNB1, se caracteriza por un mal pronóstico. Por lo que la expresión de MYC y LDHB/CCNB1 son fuertes marcadores pronósticos independientemente de la existencia de metástasis en los parámetros clínicos y del tumor residual (28).

Las mutaciones de la señalización genética Sonic Hedgehog (SHH) y (PTCH1, SUFU) se evidencian aproximadamente en un 25% de los meduloblastomas, y la expresión de la vía genética WNT ( $\beta$ -catenin, APC, AXIN), existe en un 15%; estudios recientes han demostrado que los

pacientes con tumores donde hay expresión de WNT, tiene un buen pronóstico, lo cual sugiere que pueden ser tratados con menos agresividad, lo cual implica menos efectos adversos al tratamientos (29, 31).

Los marcadores mesenquimales, epitelial y melanocítico se observan en las variantes raras de meduloblastoma. Por lo demás, es importante hacer énfasis en cuanto a la expresión de marcadores epiteliales (keratina y EMA) ya que es rara su expresión en los meduloblastomas, en particular, los casos del tipo de meduloblastoma de células anaplásicas, que de estar presente, plantea la posibilidad de un teratoma/rabdoideo atípico (30).

## **AKT EN EL CÁNCER**

En 1988 Staal y col. identifica el gen AKT1 en el cromosoma 14q32.3 mediante el análisis de células somáticas de híbrido humano y hámster. Tiene 15 exones de codificación de 480 aminoácidos ácidos (32).

El Fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) ha sido implicado en regular el crecimiento celular, proliferación, supervivencia, diferenciación, y cambios del citoesqueleto. Uno de los objetivos mejor caracterizados de los productos de PI3K es la proteína quinasa AKT, o también conocida como proteína quinasa B (PKB). En las células en reposo, el AKT reside en el citosol en una conformación de baja actividad. Durante la estimulación celular, AKT se activa a través del reclutamiento en la membrana celular de los productos de PI3K y por la fosforilación del 3'-fosfoinosítol- dependiente de quinasa -1 (PDPK1).

La activación de AKT controla la supervivencia celular a través de la fosforilación de las dianas que dependen de ella, con el resultado del incremento en la supervivencia celular, proliferación, crecimiento y metabolismo. Las dianas para la activación de AKT pueden ser clasificadas en tres grupos distintos: proteínas apoptóticas, factores de transcripción y proteína-quinasa.

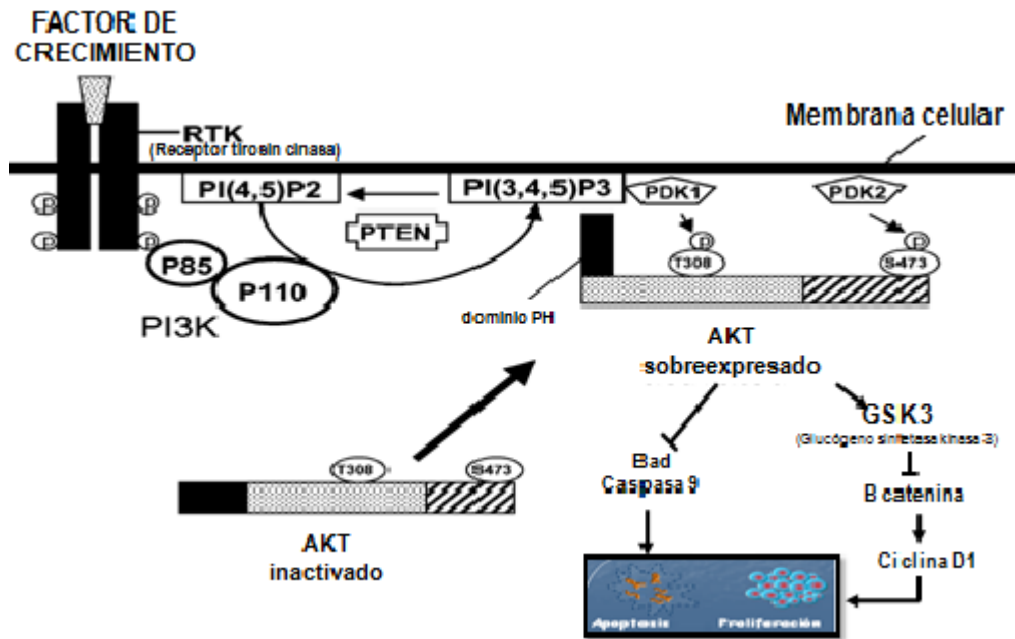
AKT fosforila directamente dos proteínas apoptóticas, BAD y caspasa 9, inhibiendo su actividad apoptótica y promoviendo por tanto la supervivencia celular.

Los factores de transcripción pueden bien ser activados o inhibidos tras la fosforilación de AKT. AKT activa el factor de transcripción NF- $\kappa$ B, HIF-1 $\alpha$  y CREB, lo que tiene como consecuencia un incremento en la transcripción de genes anti-apoptóticos. El factor de transcripción NF- $\kappa$ B es el mediador central de la respuesta inmune, de la respuesta inflamatoria y la respuesta de supervivencia celular (33).

El AKT ha sido aislado directamente del retrovirus murino AKT8, el cual se obtuvo del AKR de las células del timoma de ratón, clonadas y cuyo homólogo celular humano es el AKT1. La fosforilación proteica es fundamental en el proceso de regulación de las funciones celulares. La coordinación de ambas proteínas quinasas y fosfatasa, controlan los niveles de la fosforilación y así mismo la actividad de las proteínas blanco específico. Una de las funciones predominantes de la fosforilación proteica es la señalización de transducción. Dos de las mejores señales que se han caracterizado son las vías de transducción que involucran el cAMP-dependiente de proteínas quinasa y proteína quinasa C. Cada vía, utiliza un diferente segundo mensajero que activa la proteína quinasa, la cual a su vez, fosforila sitios moleculares específicos (34).

El AKT también puede ser activado por el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF). Otros estudios han demostrado que la activación depende también del PDGFR $\beta$ , tirosinas 740 y 751, que se unen a PIK3 ya fosforilado; ver figura 2.





**FIGURA 2.** Modelo propuesto para la activación de AKT. El factor de crecimiento al unirse a su receptor tipo tiosin cinasa (RTK), fosforila PI3K (Fosfoinositol 3 cinasa), permitiendo la fosforilación de PIP2 (fosfatidilinositol-2fosfato) a PIP3 (fosfatidilinositol-3 fosfato) así mismo, el cual recluta y activa a AKT por vía de la fosforilación de PDK1 en condiciones normales; al ser fosforilado por PDK2 en la región S-473 es sobreexpresado e inactiva varios sustratos proteicos que regulan la proliferación celular o estimulan la apoptosis ( Bad caspasa 9, GSK3, B catenina, Ciclina D1).

Los estudios realizados por Dudek et al. demostraron que el AKT es importante en la supervivencia de las neuronas cerebelares. Formulando a éstas quinasas como regulador esencial del ciclo celular. La vía de señalización por la cual el factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1), promueve la supervivencia de las neuronas del cerebelo, es la siguiente: La activación de IGF1 y PIK3 induce la activación de AKT. Estos hallazgos sugieren que el AKT interviene en el desarrollo del sistema nervioso y es un mediador crítico de factor de crecimiento inducido por la supervivencia neuronal (35).

El AKT desempeña un papel fundamental en las funciones celulares principales, tales como la proliferación y la supervivencia que con frecuencia se activan en una variedad de los cánceres humanos (32).

Por lo anterior, se ha demostrado la participación de AKT en la progresión de varios tipos de cáncer como linfomas, cáncer de mama y tiroides. Vasko et al. en el 2004 refieren la participación de AKT

en el cáncer de tiroides mediante la investigación de 46 neoplasias, 20 adenomas foliculares y el tejido normal adyacente por inmunohistoquímica de AKT activada, AKT1, -2 y -3, y la expresión de p27. La activación de AKT se encontró en 38 tipos de cáncer (10 de 10 tipos de cáncer folicular, 26 de 26 cánceres papilares y 2 de 10 variantes folicular de cáncer papilar) y en sólo 4 de los 66 cortes de tejido normal y 2 de 10 adenomas benignos folicular. AKT activada, en correlación con AKT1, se expresó con más frecuencia en zonas de invasión capsular y localizada en el citoplasma en el cáncer papilar, hacia el núcleo en el cáncer folicular, y de ambos compartimentos en los cánceres invasivos papilar (36).

La activación de AKT se ha implicado en la instrucción primaria en cánceres de SNC humano. El grado de malignidad tumoral en el glioma, se correlaciona con la actividad de AKT y activación de los puntos de señalización de AKT hacia una mala evolución clínica. En cuanto al meduloblastoma, segundo tumor cerebral maligno en los niños, ensayos en ratón han revelado que la proliferación de células tumorales depende crucialmente en la activación de la vía PI3K/AKT, lo cual se refuerza cuando existen mutaciones de PIK3CA en la subunidad p110 $\alpha$  de PI3K, tanto en el glioblastoma como en el meduloblastoma (9, 37, 38).

En la patogénesis del cáncer humano y su tratamiento, el AKT promueve la génesis de los tumores y por lo tanto la resistencia a los medicamentos mediante la interrupción de la apoptosis y la interrupción de la señalización de AKT; un ejemplo de lo anterior es la quimiorresistencia con relación a la inhibición de la rapamicina mTOR, la cual se invierte en los linfomas que expresan AKT, pero no en aquellos con otros defectos de la apoptosis. Por lo que al dirigir los programas de apoptosis se podría restaurar la sensibilidad a los fármacos en un genotipo dependiente. Lo anterior ha motivado la supresión tumoral, donde el estudio realizado por Trotman y col. demostró en un modelo de ratón, que el supresor PML de tumores, previene el cáncer mediante la inactivación de AKT fosforilado en el interior del núcleo. La deficiencia de PML lleva a la génesis de los tumores en la próstata, un tejido que es sumamente sensible a los niveles de AKT fosforilado, y demostró que la PML específicamente recluta a la fosfatasa AKT PP2A, así como AKT fosforilado en cuerpos nucleares con PML. En particular las PML-células nulas, se ven afectadas en la actividad de la fosfatasa PP2A a AKT, y por lo tanto hay acumulación a nivel nuclear de AKT fosforilado. Como consecuencia, la reducción progresiva de PML conduce a la inactivación de FOXO3A, la transcripción mediada de BIM proapoptótico y el inhibidor del ciclo celular p27 (Kip1) (39).

Se refiere en el estudio realizado por Opel, et al., en el cuál se analizaron en 116 muestras de tejido de neuroblastoma que la activación de AKT en su dominio T308 o tanto T308 como S473, es un indicador de mal pronóstico en éste tumor, ya que se correlacionó con estadio IV de la enfermedad, disminución en el tiempo libre de enfermedad y baja supervivencia en general de los pacientes. De igual forma, la activación de AKT en dichos dominios se correlacionó con variables de agresividad tumoral, incluyendo la amplificación de MYCN, aberraciones de 1p36; lo que indica que la enfermedad se encuentra en fase avanzada, edad al diagnóstico, e histología desfavorable. Lo cual demuestra que la activación de AKT se correlaciona con mal pronóstico en el neuroblastoma in vivo y con la resistencia a la apoptosis in Vitro (40). La desregulación de la señalización a través de la vía PI3K es común en la muchos tipos de tumores humanos, incluyendo glioblastoma, mama, próstata y pulmón (40, 41, 42). Por ejemplo, la activación de la vía de PI3K/AKT ha informado recientemente de que son equivalentes a aumentar el grado de agresividad del tumor, la disminución de la apoptosis y resultados clínicos adversos en el glioblastoma in vivo (40, 43, 44, 45).

## **JUSTIFICACIÓN**

El meduloblastoma es el segundo tumor maligno más frecuente en la población pediátrica y muy agresivo. En la actualidad y en nuestro medio la estadificación del riesgo en pacientes con meduloblastoma sigue siendo un reto, debido a que los parámetros clínicos son insuficientes para definir el riesgo. Hoy en día los marcadores moleculares son estudiados con interés a partir de que se ha demostrado que proveen información pronóstica, poco se ha estudiado acerca del papel que juega la sobreexpresión del AKT en el pronóstico del meduloblastoma en la edad pediátrica, por lo cual se requiere profundizar en el estudio del comportamiento biológico molecular de estos pacientes para brindar terapias más dirigidas.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Los meduloblastomas son tumores sólidos cerebrales que se presentan frecuentemente en la edad pediátrica, son un grupo de neoplasias que de acuerdo a su grado de malignidad se dividen en alto y bajo riesgo, lo cual depende en gran parte de los marcadores biológicos que presente el tumor, el comportamiento biológico y molecular de estos tumores en pediatría no se ha aclarado por completo. El AKT es un marcador asociado al pronóstico y grado de malignidad, sin embargo en la población pediátrica con meduloblastoma no se ha establecido su expresión ni asociación con la sobrevida de éstos pacientes. La importancia del presente estudio radica en conocer el comportamiento de la expresión de AKT y su impacto en la supervivencia de pacientes pediátricos con meduloblastoma, asentando las bases para estudios clínicos posteriores en pacientes con esta neoplasia.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Existe asociación entre la sobreexpresión de AKT con la sobrevida y variedades histológicas en los pacientes pediátricos con meduloblastoma?

## **HIPÓTESIS**

Los pacientes con meduloblastoma AKT+ tendrán una supervivencia menor respecto a los pacientes con meduloblastoma AKT-.

Los pacientes con meduloblastoma AKT+ se correlacionan con histología de alto riesgo.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL:**

Determinar si existe asociación entre la sobreexpresión de la proteína AKT en el pronóstico de los pacientes pediátricos con meduloblastoma.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

Determinar si existe correlación entre la sobreexpresión de AKT y la histología del meduloblastoma.

Establecer si existen diferencias en el pronóstico de los pacientes de acuerdo a la sobreexpresión de AKT.

## **MATERIAL Y MÉTODO**

### **TIPO DE ESTUDIO**

Se trata de un estudio retrospectivo, observacional, longitudinal y comparativo, constituido por una cohorte que se clasificará y comparará en función de la expresión de AKT en meduloblastoma.

### **LUGAR DEL ESTUDIO**

Unidad Médica de Atención Especializada (UMAE) en el Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional (CMN) SXXI, Servicio Oncología Pediátrica, Laboratorio de Investigación de Tumores del Sistema Nervioso Central y Servicio de Anatomopatología.

## **UNIVERSO Y MUESTRA**

La población estará constituida por pacientes con meduloblastoma de alto y bajo grado diagnosticados en la UMAE en el Hospital de Pediatría, CMN SXXI, entre el 01 de Enero de 1995 al 31 de Diciembre de 2008.

## **CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

1. Pacientes pediátricos con diagnóstico de certeza (por patología) de meduloblastoma, realizado durante el periodo comprendido entre el 1 de Enero de 1995 al 31 de Diciembre de 2008.
2. Pacientes de cualquier sexo, entre 1 y 17 años de edad.
3. Pacientes que no recibieron ningún tratamiento al momento de obtenerse la muestra del tejido tumoral.
4. Pacientes con expediente completo para obtener datos y seguimiento del curso clínico de la enfermedad.
5. Pacientes que completaron tratamiento en esta unidad o en su defecto que tuvieran un tiempo mínimo de observación de 6 meses.
6. Pacientes que contaran con muestra de tejido tumoral en bloque de parafina.

## **CRITERIOS DE ELIMINACION**

- 1.- Tejido tumoral insuficiente o inapropiado para su procesamiento inmunohistoquímico.

## **TAMAÑO DE MUESTRA**

El muestreo será de tipo no probabilístico de casos consecutivos. Se incluirán a todos los pacientes con diagnóstico de meduloblastoma por histopatología, en el periodo comprendido de Enero de 1995 a Diciembre de 2008.

## VARIABLES:

VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	UNIDADES DE MEDICIÓN	TIPO DE VARIABLE
Edad	Cuantitativa Continua	Tiempo de vida en años desde el nacimiento hasta el momento actual.	Edad cumplida en años al momento del diagnóstico	Meses	Independiente
Sexo	Cualitativa Nominal	Características fenotípicas que califican al sujeto en género femenino o masculino	Género fenotípico	Masculino Femenino	Independiente
Histología del Tumor	Cualitativa Nominal	Categorización de la tumoración según características y malignidad de acuerdo con la clasificación de la OMS	Categorización de la tumoración según características y malignidad de acuerdo con la clasificación de la OMS	Desmoplásico Clásico Anaplásico	Independiente
Expresión AKT	Cualitativa Ordinal	Observación de la tinción de inmunohistoquímica dirigida por medio de anticuerpo monoclonal contra el epítipo de AKT	Sobreexpresión de AKT mediante tinción de inmunohistoquímica	Porcentaje de células AKT Negativo: <50% de sobreexpresión por campo Positivo: >50% de sobreexpresión por campo	Independiente
Sobrevida Global	Cuantitativa Continua	Tiempo transcurrido entre el diagnóstico inicial y la presentación de la muerte o se demuestre su curación en la última cita del paciente	Tiempo transcurrido entre el diagnóstico inicial y la presentación de la muerte o se demuestre su curación en la última cita del paciente	Meses	Dependiente
Sobrevida Libre de Progresión	Cuantitativa Continua	Es el período de tiempo en el cual el paciente sobrevive sin cáncer detectable	Tiempo que transcurre desde el diagnóstico hasta que se evidencia crecimiento del tumor	Meses	Dependiente

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

**ANÁLISIS DESCRIPTIVO:** Para las variables cuantitativas continuas y discretas se utilizó mediana como medida de tendencia central y valor mínimo y máximo como medidas de dispersión.

**ANÁLISIS INFERENCIAL:** Para las variables cualitativas se utilizó frecuencias simples. Se realizaron curvas de sobrevida global y libre de enfermedad a 1.5 y 5 años con el método para

determinar porcentaje de sobrevida por grupos, en aquellos que sobreexpresan y los que no sobreexpresan AKT. 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 exacta de Fisher para determinar la asociación de las variables cualitativas y el OR para determinar el riesgo de morir. Las diferencias fueron consideradas significantes con alfa de 0.05. Los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa SPSS versión 15.

## **METODOLOGÍA**

### **1.- RECOPIACIÓN DE PACIENTES Y DATOS**

Los datos se obtuvieron a partir de la información plasmada en los expedientes clínicos de los pacientes con diagnóstico de Meduloblastoma del Hospital de Pediatría CMN SXXI, a partir del año de 1995 al 2008. Búsqueda dirigida de datos, tales como: sexo, edad al momento del diagnóstico, reporte histopatológico, fechas correspondientes al diagnóstico, localización de tumor, volumen tumoral basal y residual (postquirúrgico), quimioterapia utilizada, radioterapia, recidiva en caso de presentarse y estado actual del paciente.

**Especímenes:** Se realizó una revisión de los archivos de patología, recolectándose los bloques de parafina. Se realizó el estudio de inmunohistoquímica, y se revisaron las laminillas, clasificando la variedad de meduloblastoma de acuerdo a la OMS para determinar la sobreexpresión de AKT y su cuantificación. La evaluación de las laminillas se realizó por un patólogo experto, desconociendo datos clínicos del paciente.

### **2.- DETERMINACIÓN LA EXPRESIÓN DE AKT**

#### **INMUNOHISTOQUÍMICA**

Posterior a la localización de los bloques de parafina con tejido tumoral, se realizaron cortes de 3 micras de espesor, se desparafinaron mediante baño maría y rehidratación mediante xilol y alcoholes graduados, absoluto, al 70% y 50%, se lavaron las laminillas con agua bidestilada por 30



segundos así como con TBS (1:20, TBS Automation Wash buffer, Biocare Medical), el cual es un agente bloqueante de sitios inespecíficos de reacción y finalmente se lavarán con agua bidestilada por otros 30 segundos.

Posteriormente se realizó la recuperación de epítopes, mediante el proceso de *desenmascaramiento de epítopes*, con una solución comercial de citrato de sodio DIVA (1:10, Diva Decloaker, Biocare Medical) en una olla de presión a 125°C de temperatura. Se permitió el enfriamiento a medio ambiente de las muestras y se lavaron con agua bidestilada por 30 segundos.

Se lavaron dos veces las muestras con TBS, permitiendo una incubación a 25°C por 10 minutos. Se lavó nuevamente con TBS y se aplicó el anticuerpo primario monoclonal de conejo (1:200, AKT phosphorylated, Biocare Medical) incubandolos por 1 hora a 25°C. Se lavaron con TBS. Se agregó finalmente el anticuerpo secundario (Probe, Biocare Medical) el cuál se incubó por 15 minutos a 25°C. Se añadió HRP, peroxidasa de rábano (MACH 1 Universal HRP-Polymer Detection) por 30 minutos a 25°C, y posteriormente se reveló con cromógeno DAB (3,3D-aminobencidina, BIOCARE MEDICAL, DAB CHROMOGEN KIT, REF DB801L) incubando por 5 minutos. Finalmente se realizó contratincción con hematoxilina por 5 min. Una vez finalizada la inmunohistoquímica se deshidrató el tejido lavándolo durante 3 minutos en cada solución con agua bidestilada, alcohol al 50%, 70%, alcohol absoluto y xileno. Finalizamos con el montaje de cada laminilla para observar al microscopio.

Se incluyó un control positivo conocido, para AKT, en nuestro caso cerebelo fetal para evaluar la técnica y la calidad del tejido post-fijado que se sometió a toda la metodología.

Se determinó la reacción en microscopio de luz y se tomaron fotografías, se consideró como sobreexpresión cuando más del 50% de cada uno de los campos evaluados mostraron inmunorreactividad positiva.

Para que el médico patólogo determinara el porcentaje de positividad revisó 10 campos de alta resolución, y contó las células tumorales observadas por campo y de éstas el número de células positivas, de esta manera se estableció el porcentaje de positividad.

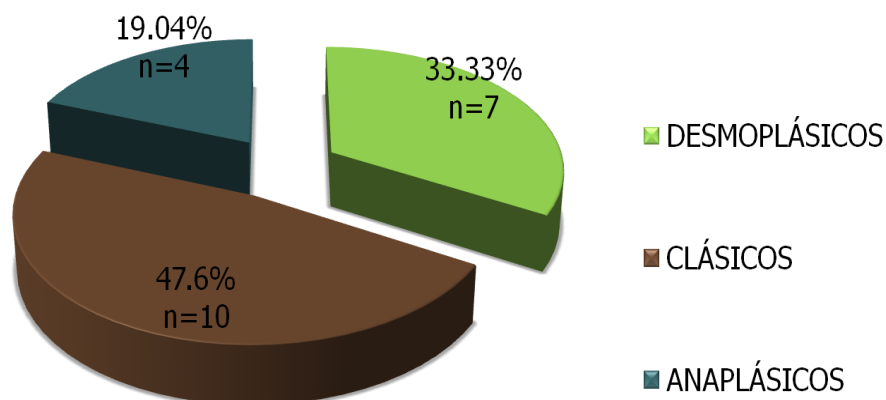
## RESULTADOS

Durante el periodo comprendido de Enero de 1995 a Diciembre de 2008, se capturaron un total de 36 pacientes; de los cuales se excluyeron 15 por no contar con bloque de parafina, quedando un total de 21 pacientes. Las características generales de los pacientes se presentan en el Cuadro 1; como se observa, de los pacientes incluidos 16 fueron masculinos (76.2%) y 5 femeninos (23.8%), con una relación hombre:mujer de 3.2:1. La mediana de edad al momento del diagnóstico fue de 72 meses con un rango de 12 a 180 meses. Solo 4 (19.04%) pacientes fueron menores de 36 meses de edad. Por su variedad histológica de los 21 pacientes diagnosticados con meduloblastoma incluidos en el presente estudio, 10 pacientes (47.6%) tuvieron tumoración que correspondió a variedad clásica, 7 (33.33%) fueron desmoplásicos y 4 (19.04%) anaplásicos. En la figura 1, se representa la distribución de los tumores respecto a su variedad histológica.

**CUADRO 1. Características del grupo en estudio**

		<b>n</b>	<b>%</b>
Edad	<36 meses	4	19.04%
	>36 meses	17	80.95%
Sexo	Femenino	5	23.8%
	Masculino	16	76.2%
Histología	Desmoplásico	7	33.33%
	Clásico	10	47.6%
	Anaplásico	4	19.04%
Quimioterapia	ICE	13	61.9%
	Carboplatino/VP16	8	38.09%

**FIGURA 1. Distribución de los pacientes con meduloblastoma por variedad histológica**



En cuadro 2 se presenta la distribución de las variables; de los pacientes incluidos, 12 (57.1%) se encuentran vivos, teniendo un total de 9 defunciones (42.9%), de los cuales, 1 fue del género femenino y 8 masculinos ( $p=0.258$ ; IC 95% 0.065-2.46). Con un riesgo (OR) de morir por ser hombre 4:1. La mediana de supervivencia de todo el grupo de pacientes incluidos fue de 49.52 meses (2-172 meses).

Con respecto a la edad, de los 4 pacientes menores de 36 meses, 2 (50%) están vivos, en comparación con 10 (46.61%) de aquellos mayores de 36 meses ( $p=0.586$ ); OR 1.214 (IC 95% 0.391-3.769).

Con respecto a los pacientes con tumor desmoplásico sobrevivió el 45.71% con una mediana de 66, en cuanto al grupo de pacientes con tumoración variedad clásica la sobrevida fue del 32% con una mediana de 29 y por último, en el grupo de tumor anaplásico la sobrevida fue del 75% con una media de 130.

De los 21 pacientes incluidos, hubo un total de 9 defunciones (42.9%), de los cuales 5 correspondieron a histología de meduloblastoma clásico, 1 a anaplásico y 3 desmoplásicos; no pareciendo encontrar asociación y riesgo de muerte con la histología.

Es muy importante señalar que el esquema de tratamiento utilizado sí fue un factor pronóstico importante. Del grupo evaluado en el estudio 13 (61.9%) recibieron quimioterapia con ifosfamida, carboplatino y etopósido (ICE) y los restantes 8 (38.1%) recibieron sólo doble droga con carboplatino y etopósido, existiendo diferencia aunque no significativa, sí con relevancia clínica ( $p=0.166$ ) dando un factor protector el haber recibido ICE con respecto a la otra doble droga  $OR=0.49$ .

**CUADRO 2. Distribución de las variables con Sobreexpresión de AKT y riesgo de morir**

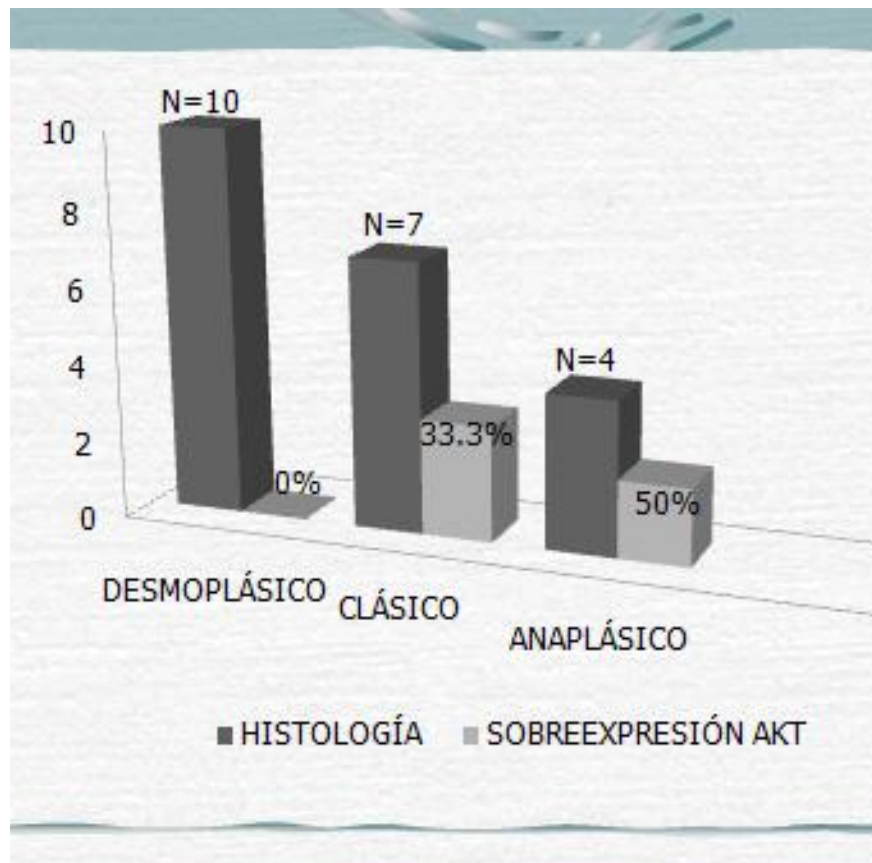
VARIABLE	AKT		% n	% SOBREVIDA	OR	95% Intervalo de Confianza		P
	>50% Positivo	<50% Negativo						
<b>GÉNERO</b>								
Femenino	2	3	23.80%	20	0.40	0.065	2.469	0.258*
Masculino	3	13	76.19%	5				
<b>EDAD</b>								
<36 meses	1	3	19.04%	50	1.214	0.391	3.769	0.586*
>36 meses	4	13	80.95%	46.61				
<b>HISTOLOGIA</b>								
Desmoplásico	0	7	33.33	45.71				0.141**
Clásico	3	7	47.6	32				
Anaplásico	2	2	19.04	75				
<b>QUIMIOTERAPIA</b>								
ICE	3	10	61.9	69.2	0.49	0.185	1.307	0.166*
CARBO/MP16	2	6	38.1	37.5				
<b>ESTADO ACTUAL</b>								
Vivo	4	8	57.1	75% AKT +	0.40	0.065	2.469	0.258*
Muerto	1	8	42.9	38.8% AKT-				

\*Fisher 's Exact test

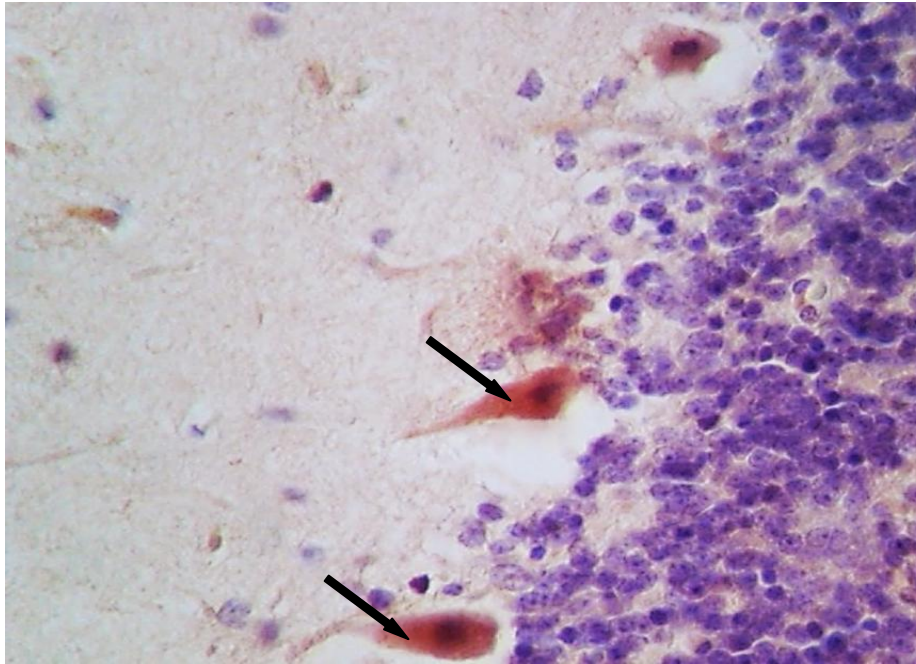
\*\*Pearson Chi-square test

La frecuencia de cada una de las variedades histológicas y su sobreexpresión de AKT se presentan en la Figura 2. De los 4 tumores variedad anaplásica 2 (50%) fueron positivos para AKT; y los otros 3 (42.85%) correspondieron a histologías clásicas. Es importante mencionar que de los 7 tumores variedad desmoplásico, ninguno marco positivo para AKT ( $p=0.141$ ).

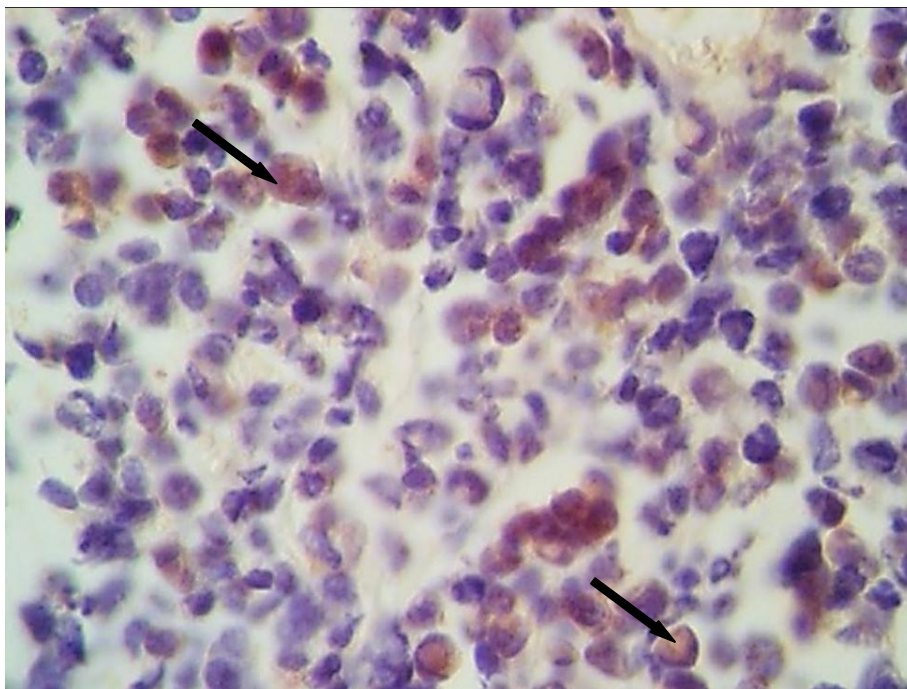
**FIGURA 2. Variedad histológica de meduloblastoma y su porcentaje de sobreexpresión con AKT**



En la figura 3 observamos cerebelo como control positivo, donde se tiñen las células de Purkinje y en la figura 4 se muestra la microfotografía de meduloblastoma variedad anaplásico, sus células son redondas grandes con núcleos prominentes y sobreexpresión de AKT en su citoplasma.



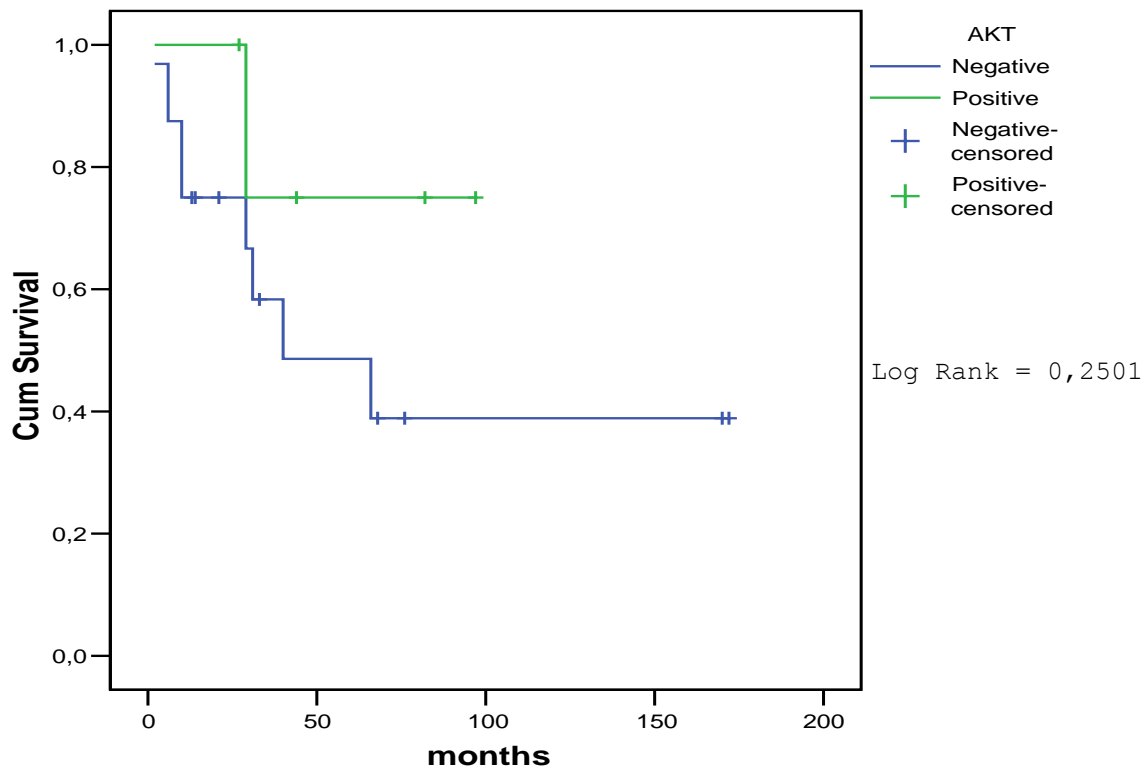
**FIGURA 3: Microfotografía de cerebelo con en la que se identifica células de Purkinge (flecha) en cerebelo positivas al AKT (control positivo). 40x**



**FIGURA 4: Microfotografía de estudio de inmunohistoquímica con la evidencia de identificación de AKT positivo en citoplasma (flecha) de células neoplásicas por meduloblastoma anaplásico (40X).**

En cuanto a la sobreexpresión de AKT 5 pacientes (23.8%) fueron positivos y 16 (76.2%) negativos; como se muestra en la figura 3, la sobrevida de acuerdo al método de Kaplan Meier fue del 75% (media = 80) 18 meses, 45.3% a 36 meses y 34% a 60 meses teniendo AKT positivo contra un 38.8% (media = 84) a 18 meses teniendo AKT negativo ( $p=0.258$ ); OR 0.40 (IC 95% 0.65-2.469).

**FIGURA 3. Probabilidad de Sobrevida Global según sobreexpresión de AKT**



## DISCUSIÓN

El conocimiento de los diferentes mecanismos biológicos implicados en el crecimiento y progresión tumoral alienta hacia un mejor sistema de estratificación. El identificar marcadores moleculares puede conducir al desarrollo de drogas dirigidas, ajustando el tratamiento de acuerdo al nuevo portafolio de biomarcadores moleculares, ofreciendo a los pacientes un mejor pronóstico. Los parámetros clínicos (metástasis, tumor residual y edad) generalmente usados para estratificación de riesgo, no son completamente satisfactorios en predecir la respuesta a la terapia. Uno de los objetivos del presente estudio fue evidenciar al AKT como un oncogen para complementar la estratificación de riesgo en los meduloblastomas. Basados en la experiencia reportada en la literatura internacional de AKT, podemos afirmar que el AKT está implicado tanto en vías de diferenciación celular de linfomas, como tumores de SNC tipo meduloblastoma para proliferación celular y antiapoptótico, el cuál es un oncogen que si se sobreexpresa, hay mayor proliferación celular, lo anterior coincide con lo reportado en su estudio por Hartmann W, et al (9) que al analizar 22 muestras de meduloblastoma se observo que la proliferación celular dependió de la presencia de AKT.

Sin embargo, en nuestro trabajo no podemos concluir lo mismo, más aún el sobreexpresar AKT pareciera asociarse a factor protector, posiblemente por el tamaño de muestra que fue pequeño.

No son iguales los meduloblastomas desmoplásicos que los meduloblastomas anaplásicos, ya que los primeros son de mejor pronóstico, y de acuerdo a nuestra serie, AKT no se expreso en esta primera variedad histológica de meduloblastomas. En contraste, la expresión de AKT se identifico en variedad histológica más agresiva en un 42.85% de tipo clásico y un 50% de tipo anaplásico, siendo este último el de peor pronóstico. Pareciera que existe asociación de AKT; si bien, no con los tres diferentes tipos de meduloblastoma, sí con la subvariedad anaplásica. No encontramos asociación con respecto a aquellos pacientes con meduloblastoma que expresan AKT contra los que no lo expresaron (75% Vs 38.8%), que si bien el esquema de tratamiento utilizado sí fue un factor pronóstico importante.

Respecto a nuestro porcentaje de sobrevida, el 57.1% de los pacientes incluidos en nuestro estudio se encuentran vivos; en los estudios realizados por Crawford JR, et al y Raimondi AJ et al. (7, 16) refieren una sobrevida similar, donde los pacientes que tienen una resección parcial o total del



meduloblastoma no metastásico tienen un mejor pronóstico que los de biopsia, seguidos de radioterapia donde la sobrevida a 5 años es de un 78% contra una 43%.

En cuanto a la edad de diagnóstico de muduloblastoma tuvimos que la sobrevida en mayores de 36 meses fue del 46.51%, lo cual difiere con lo reportado por Rossi A, et al. (31), donde reportan una sobrevida en mayores de 36 meses de hasta el 70% combinado con quimioterapia y radioterapia, teniendo en consideración que nuestro tamaño de muestra fue pequeño.

Nuestros resultados concuerdan, en parte, a lo reportado por Hartmann W y col (9), ya que en su serie de 22 muestras de meduloblastoma humano refieren que mediante inmunohistoquímica, todos presentaron niveles detectables de AKT, tanto en meduloblastomas desmoplásicos como en clásicos. En otro estudio realizado por Wtodarski P y col. (45) donde evalúan la sobreexpresión de AKT mediante western blot, donde sólo reportan en 8 meduloblastomas de 10 la sobreexpresión de AKT, donde 7 fueron clásicos y 1 desmoplásico; nosotros sólo evidenciamos la sobreexpresión en 5 casos, concordamos que 3 de 7 meduloblastomas variedad clásica sí sobreexpresaron AKT, diferimos con lo reportado con Hartmann W y col. en el caso de los meduloblastomas variedad desmoplásico, ya que de 7 muestras de tejido de meduloblastoma desmoplásico, ninguno sobreexpresó AKT. Al igual que Wtodarski y col. al sólo comprobar la sobreexpresión de AKT en 1 muestra de desmoplásico, y nosotros en ninguna, concordamos con la literatura universal que ésta variedad histológica de meduloblastoma es la menos agresiva; reportamos que el 50% de nuestros casos de meduloblastoma anaplásico también sobreexpresan dicha proteína. En los estudios previamente comentados no incluyeron esta variedad histológica de meduloblastoma.

El objetivo general del presente estudio, fue encontrar una asociación de mayor riesgo en aquellos pacientes con meduloblastoma que expresan AKT y a pesar de no encontrar dicha asociación, hay que considerar que el tamaño de muestra fue pequeño y que sí pareciera existir una asociación entre la sobreexpresión de AKT con sus variedades histológicas más agresivas y la asociación de meduloblastoma desmoplásico, al no sobreexpresar AKT es de buen pronóstico.

Por lo que consideramos es importante dar seguimiento al estudio hasta tener conclusiones más sólidas y para dar pie a estudios posteriores de terapias moleculares dirigidas.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1.- López-Aguilar E. Tumores Cerebrales. Algunos aspectos epidemiológicos, cuadro clínica y tratamiento. Tumores del Sistema Nervioso Central en Pediatría En Prensa: 8-15.
- 2.- López-Aguilar E, Sepúlveda-Vildósola A, Betanzos-Cabrera Y, Gascón-Lastiri G, Ortiz-Suárez L, Rivera-Márquez H, et. al. Factores pronósticos y sobrevida de pacientes pediátricos con ependimomas. Gac Méd Méx 2009; 145: 7-13.
- 3.- Fajardo-Gutiérrez A. Mortalidad por cáncer en niños. Bol Med Hosp Infant Mex 2005; 62:1-3.
- 4.- Fajardo-Gutiérrez A, Juárez S, González G, Palma V, Mejía-Arangure J, et al. Incidence of cancer in children residing in ten jurisdictions of the Mexican Republic: importance of the Cancer registry (a population-based study). BMC Cancer 2007; 7:1-15.
- 5.- Packer R. Childhood Brain Tumors: Accomplishments and Ongoing Challenges. J Child Neurol 2008; 23: 1122-1127.
- 6.- Rivera-Luna R, Niembro A, Zarco A, Marhx A, Cárdenas R, et al. Meduloblastoma en pediatría. Pronóstico y tratamiento en la actualidad. Gac Méd Méx 2007; 143:415-420.
- 7.- Crawford JR, MacDonald T, Packer RJ. Medulloblastoma in childhood: new biological advances. The Lancet Neurology 2007; 6:1073-85.
- 8.- MacDonald T, Brown K, LaFleur B, Peterson K, Lawlor C. Expression profiling of medulloblastoma: PDGFRA and the RAS/MAPK pathway as therapeutic targets for metastatic disease. Nature Genet. 2001; 29:143-152.
- 9.- Hartmann W, Digon-Söntgerath B, Koch A, Waha A, Endl E, Dani I, et al. Phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT signaling is activated in medulloblastoma cell proliferation and is associated with reduced expression of PTEN. Clin Cancer Res 2006; 12:3019-3027.
- 10.- Blanco-Aparicio, Renner O, Leal J. PTEN, more than the AKT pathway. Carcinogenesis. 2007; 28:1379-1386.
- 11.- Hambardzumyan D, Becher O, Rosenblum M. PI3K pathway regulates survival of cancer stem cells residing in the perivascular niche following radiation in medulloblastoma in vivo. Genes Dev. 2008; 22:436-448.
- 12.- Crawford J, MacDonald T, Packer R. Medulloblastoma in childhood: new biological advances. Lancet Neurol 2007; 6:1073-1085.

- 13.- Grizzi F, Weber C, Di Ieva A. Antiangiogenic Strategies in Medulloblastoma: Reality or Mystery 2008; 63; 584-590.
- 14.- Packer P, Cogen P, Vezina G, Rorke L. Medulloblastoma: Clinical and biologic aspects. *Neuro-Oncology* 1999; 1:232–250.
- 15.- Wilne S, Collier J, Kennedy C. Presentation of childhood CNS tumours: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol* 2007; 8: 685–95.
- 16.- Raimondi AJ, Tomita, T. Medulloblastoma in childhood. *Acta Neurochir* 1979; 50:127.
- 17.- Crawford JR, Ohgaki H, Wiestler O, Cavenee W, Burger P, et al. The 2007 WHO Classification of tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol* 2007; 114:97–109.
- 18.- Lanzkowsky Philip. *Manual of Pediatric Hematology and Oncology*. Ed Elsevier. 4ed. 521-524.
- 19.- 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; 38:769-73.
- 20.- Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 2004; 432:396-401.
- 21.- Bao S, Wu Q, McLendon RE, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 2006; 444:756-60.
- 22.- Bjerkvig R, Tysnes BB, Aboody KS, Najbauer J, Terzis AJA. Opinion: the origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights. *Nat Rev Cancer*. 2005; 5:899-904.
- 23.- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001; 414:105-11.
- 24.- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100:57-70.
- 25.- Graham P, Burger C, Eberhart C. Biologic Risk Stratification of Medulloblastoma: The Real Time Is Now. *J Clin Oncol* 2004; 22:1-4.
- 26.- Gilbertson R, Clifford S. PDGFRB is overexpressed in metastatic medulloblastoma. *Nature Genet* 2003; 35: 197-198.
- 27.- Northcott P, Nakahara Y, Wu X, Feuk L, Ellison D, et al. Multiple recurrent genetic events converge on control of histone lysine methylation in medulloblastoma. *Nature Genet* 2009; 41: 465-472.

- 28.- Haas T, Hasselt N, Troost D, Caron H, Popovic M, Molecular risk stratification of medulloblastoma patients based on immunohistochemical analysis of MYC, LDHB, and CCNB1 expression. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 4154-60.
- 29.- Kool M, Koster J, Bunt J, Hasselt E, Lakeman A, et al. Integrated genomics identifies five medulloblastoma subtypes with distinct genetic profiles, pathway signatures and clinicopathological features. *PLoS ONE* 2008; 3:1-14.
- 30.- Takei H, Bhattacharjee M, Rivera A, Dancer Y, Powell S. New immunohistochemical markers in the evaluation of Central Nervous System tumors. A review of 7 selected adult and pediatric brain tumors. *Arch Pathol Lab Med.* 2007; 131:234–241.
- 31.- Rossi A, Caracciolo V, Russo G, Reiss K, Giordano A. Medulloblastoma: From molecular pathology to therapy. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 971-976.
- 32.- Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis* 2004; 9:667–676.
- 33.- Vanhaesebroeck B, Alessi D. The PI3K–PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* 2000; 346: 561-576.
- 34.- Staal, S. Molecular cloning of the AKT oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1987; 84: 5034-5037.
- 35.- Dudek H, Datta S, Franke T, Birnbaum M, Yao R., Cooper G, et al. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase AKT.. *Science* 1997; 275: 661-663.
- 36.- Vasko V, Saji M, Hardy E, Kruhlak M, Larin A, Savchenko V, et al. AKT activation and localisation correlate with tumour invasion and oncogene expression in thyroid cancer. *J. Med. Genet.* 2004; 41:161-170.
- 37.- Broderick D, Di C, Parrett T, Samuels Y, Cummins J, McLendon R, et al. Mutations of PIK3CA in anaplastic oligodendrogliomas, high-grade astrocytomas, and medulloblastomas. *Cancer Res* 2004; 64:5048–5050.
- 38.- Schüller U, · Ruiter M, · Herms J, · Kretschmar H, · Grasbon-Frodl E. Absence of mutations in the AKT1 oncogene in glioblastomas and medulloblastomas. *Acta Neuropathol* 2008; 115:367–368.
- 39.- Trotman L, Alimonti A, Scaglioni P, Koutcher J, Cordon-Cardo C, Pandolfi P. Identification of a tumour suppressor network opposing nuclear Akt function. *Nature* 2006; 441:523-536.
- 40.- Opel D, Poremba C, Simon T, Debatin K, Fulda S. Activation of AKT Predicts Poor Outcome in Neuroblastoma. *Cancer Res* 2007; 67: 735-745.

41. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:489–501.
42. Perez-Tenorio G, Stal O, Southeast Sweden Breast Cancer Group. Activation of AKT/PKB in breast cancer predicts a worse outcome among endocrine treated patients. *Br J Cancer* 2002; 86:540–545.
43. Chakravarti A, Zhai G, Suzuki Y, et al. The prognostic significance of phosphatidylinositol 3-kinase pathway activation in human gliomas. *J Clin Oncol* 2004; 22:1926–1933.
44. Choe G, Horvath S, Cloughesy TF, et al. Analysis of the phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathway in glioblastoma patients in vivo. *Cancer Res* 2003; 63:2742–2746.
- 45.- Wtodarski P, Grajkowska W, Lojek M, Rainko K, Józwiak J. Activation of AKT and Erk pathways in medulloblastoma. *Neuropathol* 2006; 44 (3): 214-220.

# ANEXO 1. HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Escriba o en su caso marque la opción adecuada

## ***IDENTIFICACIÓN***

Nombre: \_\_\_\_\_

Edad: \_\_\_\_\_ Género: Masculino (1) Femenino (2)

Afiliación: \_\_\_\_\_

Bloque de parafina: \_\_\_\_\_

Diagnóstico fecha: \_\_\_\_\_ Edad de diagnóstico: \_\_\_\_\_

Diagnóstico definitivo de patología: \_\_\_\_\_

## ***CARACTERÍSTICAS TUMORALES***

Histología tumoral: Desmoplásico (1) Clásico (2) Anaplásico (3)

Tamaño tumoral: Diámetros mayores: \_\_\_\_\_ Centímetros cúbicos: \_\_\_\_\_

## ***EXPRESIÓN AKT***

Expresión AKT: Negativo (1) Positivo (2)

## ***RESPUESTA AL TRATAMIENTO Y SEGUIMIENTO***

Fecha de última cita: \_\_\_\_\_

Fecha de muerte: \_\_\_\_\_

Causa de la muerte: \_\_\_\_\_

QT recibida: \_\_\_\_\_

Radioterapia si ( ) No ( )

Numero de sesiones: \_\_\_\_\_ Gy \_\_\_\_\_

Respuesta al tratamiento: Completa(1) Parcial(2) Enfermedad estable(3) Progresión(4)