



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI
HOSPITAL DE PEDIATRIA "SILVESTRE FRENK FREUND"**

**" ASOCIACIÓN DE LA SOBREENPRESIÓN DE MGMT CON LA RESPUESTA AL
TRATAMIENTO Y SOBREVIDA EN NIÑOS CON ASTROCIOMAS MANEJADOS CON
TEMOZOLAMIDA**

TESIS

PARA OBTENER EL DIPLOMA DE SUBESPECIALIDAD EN:

ONCOLOGIA PEDIATRICA

PRESENTA:

DRA. ERIKA EVELYNE REYES GUTIERREZ

TUTOR:

DR. JAVIER ENRIQUE LOPEZ AGUILAR

COTUTOR Y ASESOR METODOLÓGICO:

DRA. ANA CAROLINA SEPULVEDA VILDASOLA

MEXICO, D.F.

FEBRERO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



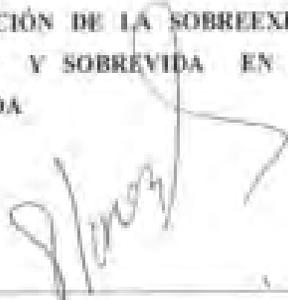
UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TÍTULO DE LA TESIS: ASOCIACIÓN DE LA SOBREEXPRESIÓN DE MGMT CON LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO Y SOBREVIDA EN NIÑOS CON ASTROCITOMAS MANEJADOS CON TEMOZOLAMIDA



DR. JAVIER ENRIQUE LÓPEZ AGUILAR
JEFE DEL SERVICIO DE ONCOLOGÍA PEDIÁTRICA
PRESIDENTE



DRA. JULIA ROCÍO HERRERA MARQUEZ
JEFE DE LA DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN
SECRETARIO



DRA. ALICIA GEORGINA SIGORDIA REYES
MÉDICO ADJUNTO ENCARGADO DEL SERVICIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA
VOCAL



DRA. YADIRA BETANZOS CABRERA
MÉDICO DE BASE SERVICIO DE ONCOLOGÍA PEDIÁTRICA
VOCAL



DR. DIEGO ARENAS ARANDA
JEFE DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN GENÉTICA HUMANA
VOCAL

INDICE

Resumen estructurado.....	4
Antecedentes.....	5
Justificación	14
Planteamiento del problema.....	15
Hipótesis.....	15
Objetivos.....	16
Material y métodos.....	16
Definición de Variables.....	18
Metodología.....	20
Resultados.....	23
Discusión.....	36
Conclusiones.....	42
Bibliografía.....	43
Anexos.....	46

RESUMEN ESTRUCTURADO

ASOCIACIÓN DE LA SOBREENPRESIÓN DE MGMT CON LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO Y SOBREVIDA EN NIÑOS CON ASTROCITOMAS MANEJADOS CON TEMOZOLAMIDA

¹Reyes Gutiérrez Erika Evelyne, ²López Aguilar Enrique, ³Sepulveda Vildósola Ana Carolina, ⁴ Siordia Reyes Alicia Georgina.

1. Residente de segundo año de Oncología pediátrica, 2Médico Jefe de Servicio de oncología pediátrica. 3. Directora de Investigación y Educación CMN SXXI, 4. Médico Patólogo adscrito al Hospital de Pediatría CMN SXXI.

ANTECEDENTES: El descubrimiento epigenético del involucro de la metilación celular como factor pronóstico y de respuesta como factor de quimioresistencia se ha utilizado en el tratamiento de astrocitomas. La temozolomida se ha convertido en la droga estándar complementando al esquema ifosfamida/carboplatino/etopósido para el tratamiento quimioterápico de los gliomas con alto grado de malignidad. Se ha reportado que el estado de metilación del promotor metilguanina DNA metiltransferasa (MGMT) puede ser un factor pronóstico en la supervivencia de estos pacientes, así como un factor pronóstico del beneficio de la quimioterapia con temozolamida.

DISEÑO: Cohorte, retrospectivo.

OBJETIVO: Determinar la asociación entre la sobreexpresión de MGMT con la respuesta al tratamiento con temozolomida y supervivencia de los niños con tumores cerebrales tipo astrocitomas.

MATERIAL Y MÉTODOS: Se obtendrán datos a partir de los registros del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional SXXI de los pacientes diagnosticados con astrocitoma de alto grado del periodo comprendido entre el 1° de Enero del 2008 al 31° de Diciembre de 2012. Se realizaron las pruebas de inmunohistoquímica en el laboratorio de investigación para obtener la expresión en los astrocitomas de MGMT para cada muestra se realizó un control isotipo negativo, control positivo de calidad de tinción y control de expresión antigénica del material, en base a la intensidad de tinción. La expresión de MGMT se aceptó como positiva cuando fue evidente una tinción de coloración rojiza en núcleo positivo. Se llevó a cabo un estudio estadístico de la supervivencia mediante los pruebas de Kaplan Meier y Log Rank.

RESULTADOS: Se realizó inmunohistoquímica tanto en tejido tumoral como en muestra testigo de cáncer de mama el cual expresa la misma cantidad de positividad. En cuanto a nuestro estudio la expresión de MGMT resultó positiva en 6 pacientes (25%) mientras que 18 pacientes resultaron negativos (75%). De los 6 pacientes positivos para MGMT se reportan 2 muertes (33.3%) y 4 permanecen vivos al cierre del estudio (66.6%) sin presentar significancia estadística para la supervivencia ($p=0.296$). El OR para fallecer si la MGMT es positiva es de 1.5 (IC 95% 0.361-6.230). 5 de los 6 pacientes positivos para MGMT presentaron en algún momento de la evolución progresión tumoral. La resección tumoral no tuvo significancia estadística ($p=0.151$) sin embargo si se observó significancia clínica observando sólo 2 muertes (14.2%) en 14 resecciones completas y 4 muertes (40%) en 10 resecciones parciales. Sin embargo la progresión tumoral si resultó una variable significativa para la supervivencia ($p= 0.017$) que para los que no presentaron progresión con un OR de 7 (IC 95% 0.959-51.094) donde los 5 pacientes que presentaron progresión tumoral fallecieron y sólo un paciente sin progresión tumoral falleció.

CONCLUSIONES: Este estudio demuestra que la metilación MGMT se correlaciona inversamente con la expresión del gen MGMT, pero también señala que la relación entre la metilación y la expresión no es absoluta. Su importancia en el uso clínico para el propósito de superar la resistencia a la temozolamida es todavía limitada.

ANTECEDENTES

Los tumores cerebrales, representan el tipo de tumor sólido más frecuente en la edad pediátrica, siendo los astrocitomas los más comunes (1, 2, 4). A nivel mundial representan 60% y son más frecuentes en el sexo masculino, la raza blanca y en menores de cinco años. (2)

En estudios realizados en población del D. F, la incidencia es de 17 casos por millón por año lo que significa aproximadamente 560 nuevos casos por año con lo que ocupa el segundo lugar como causa de morbilidad, en la población pediátrica (2, 3).

El cáncer en los niños en México es en la actualidad uno de los problemas más importantes de salud pública. La frecuencia de presentación de los tumores cerebrales es de 12% (2, 3). En México los tumores del sistema nervioso central ocupan el tercer lugar de las neoplasias malignas en niños (3).

Debido a la falta de un programa nacional para el registro de cáncer infantil, en México sólo existen datos de la incidencia de cáncer en los niños que residen en la Ciudad de México y que tienen derecho a un trato por el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Esta situación se traduce en un problema grave, en que la magnitud del problema de cáncer en la infancia, en la mayor parte de las jurisdicciones del país es desconocida. La incidencia de cáncer infantil en Chiapas es mayor que el reportado en todo el mundo (4)

Aproximadamente la tercera parte de los tumores del SNC en niños menores de 15 años son diagnosticados antes de la edad de 5 años y son bastante constantes de año a año. (5)

La sobrevida de pacientes con astrocitoma es de 56% a 60 meses. La expectativa de vida de acuerdo a la SEER (Surveillance, Epidemiology, End Result) a los cinco años es de 50%. (3)

Durante los primeros 2 años de vida, los tumores supratentoriales predominan, mientras que las lesiones infratentoriales son más comunes en el resto de la primera década. Los tumores supratentoriales nuevamente predominan durante la adolescencia y hasta la edad adulta. (5)

La transformación neoplásica se produce en todos los tipos de células gliales del sistema nervioso humano, produciendo una amplia variedad de entidades clínico-patológicas y variantes morfológicas. (6)

Los astrocitomas son más frecuentes y abarcan un espectro extraordinariamente amplio, que va desde el crecimiento lento astrocitoma pilocítico juvenil para el glioblastoma multiforme altamente maligno. Este cambio se clasifican morfológicamente en los esquemas de clasificación histológica y está asociado con la adquisición secuencial de alteraciones genéticas. (6)

Se clasifican según la OMS en una escala de grados según la conducta biológica, y con esta clasificación se predice: respuesta al tratamiento y pronóstico. (7)

La clasificación internacional de tumores publicados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) se inició a través de un acuerdo del Consejo Ejecutivo de la OMS en 1956 y de la Asamblea Mundial de la Salud en 1957. La primera edición de la clasificación histológica de los tumores del sistema nervioso ha sido editado por Zülch y publicado en 1979. La segunda edición refleja los avances provocados por la introducción de la inmunohistoquímica en la patología de diagnóstico; fue editado por Kleihues y cols. La tercera edición, editado por Kleihues y Cavenee publicado en el 2000 incorpora perfiles genéticos como auxiliares adicionales a la definición de los tumores cerebrales. En la clasificación se basa en el consenso del international Working Group, un grupo de 25 patólogos y genetistas se reunieron en el Centro Alemán de Investigación Oncológica en Heidelberg, en noviembre de 2006 y los resultados de sus deliberaciones y las de otros 50 contribuyentes están contenidos en la clasificación de la OMS 2007 de los tumores del sistema nervioso central. (8)

Los factores de mal pronóstico ya conocidos son: edad menor de tres años, ya que a estos pacientes no se le puede ofrecer radioterapia, así como localización e histología. Se han identificado también diversos marcadores biomoleculares que influyen en el pronóstico de estos pacientes. El conocimiento de los factores pronósticos, permite adecuar el tratamiento a éstos pacientes. A pesar de que se conocen algunos factores pronósticos, continúa habiendo un grupo de pacientes con evolución desfavorable, por lo que es importante determinar los factores que llevan a un peor pronóstico, y de esta manera diferenciarlos y tratarlos de una manera más intensiva. (3)

Las características de los tumores gliales de bajo grado son su lenta evolución, el comportamiento clínico y la apariencia histológica relativamente benigna. En general, las tasas altas de supervivencia a largo plazo son características, así, a pesar de las bajas tasas pero constante de la progresión de la enfermedad incluso 10 años desde el diagnóstico. Los astrocitomas cerebelosos son los más frecuentes, representando del 15% al 25% de todos los tumores del SNC, seguido en prevalencia de los astrocitomas cerebrales hemisféricos y tumores profundos de las estructuras de la línea media así como los tumores de la vía óptica (que representa aproximadamente el 5% de todos los tumores del SNC). El astrocitoma clásico, o pilocítico, corresponden el 80% y el 85% de estos tumores. El segundo tipo de astrocitoma cerebeloso es el astrocitoma difuso o fibrilar, lo que representa el 15% de los astrocitomas cerebelosos. Los tumores supratentoriales de alto corresponden al astrocitoma anaplásico, glioblastoma multiforme y tumores gliales mixtos con predominio de elementos malignos astrocíticos. Estos tumores representan 7% a 11% de los tumores del SNC en niños. Aproximadamente el 25% de los tumores astrocíticos malignos o de alto grado se producen en las estructuras profundas de la línea media del cerebro, el 15% se producen en la fosa posterior, y la mayoría se producen en los hemisferios cerebrales. Los astrocitomas de alto grado son clínicamente agresivos, invasivos regionalmente, y capaz de dar metástasis extraneural a pulmón, ganglios linfáticos, hígado, y

hueso. En los niños, estos y otros gliomas malignos se presentan con mayor frecuencia en los hemisferios cerebrales. (5)

Los tumores cerebrales primarios, en particular, el glioblastoma multiforme (GBM), siguen teniendo una supervivencia sombría a pesar de los avances en el tratamiento de otras neoplasias. El limitado conocimiento de los mecanismos que subyacen a la tumorigénesis del cerebro limitan severamente las opciones preventivas y terapéuticas para los pacientes. El tratamiento estándar actual para GBM consiste en la resección quirúrgica seguida de radioterapia adyuvante (RT), con o sin quimioterapia concomitante. Lamentablemente, este régimen sólo se ofrece a los pacientes con GBM un beneficio en la supervivencia media de 14,6 meses, una mejora de 12 meses sobre la resección sola. Es importante tener en cuenta que la radioterapia y quimioterapias están, a nivel molecular, basados en la inducción del daño en el ADN de la célula tumoral para provocar su muerte. Desafortunadamente, estas terapias también causar daños en el ADN en el tejido circundante neuronal, dando lugar a una variedad de efectos secundarios locales y sistémicos. (9)

Como tal, hay un importante esfuerzo de investigación que buscan descubrir nuevos regímenes terapéuticos que maximizan la eliminación del tumor y reducir al mínimo estos efectos tóxicos tejido normal, basado en la comprensión de las diferencias en los comportamientos y las vías de las células sanas y neoplásicas. Una característica crítica de la célula eucariota es su capacidad de mantener la estabilidad del genoma a través de generaciones, atribuido, en parte, a los mecanismos sofisticados de regulación y reparación de ADN. Las deficiencias en este proceso ha sido ampliamente asociado con un número de subtipos de astrocitomas. Las vías por las cuales las células corrigen el rompimiento de doble cadena de ADN son de particular interés. Una reparación de rompimiento de doble cadena de ADN errónea conduce a reordenamiento genómico bruto, que puede resultar en inestabilidad genómica y en una tumorigénesis. (9)

Ha sido bien establecido que el rompimiento de doble cadena de ADN se reparan a través de al menos dos vías distintas: la recombinación homóloga (HR) y no homóloga (Non-homologous End – joining NHEJ). Ambos mecanismos de reparación tienen implicaciones en la tumorigénesis, teniendo impacto de respuesta al tratamiento actual, así como su utilidad potencial como dianas terapéuticas en el manejo de los tumores cerebrales. La HR es la principal vía de reparación de la doble cadena de ADN durante las fases S y G2 del ciclo celular, mientras que en la NHEJ la función es predominantemente durante G1 cuando la reparación HR no está disponible. (9)

Papel de la O6- Metilguanin DNA transferasa

La iniciación y la progresión del cáncer humano no sólo dependen de alteraciones genéticas, sino también en los cambios epigenéticos como la metilación del ADN. La hipermetilación aberrante del ADN en las regiones promotoras de genes es el cambio epigenético mejor definido en los tumores. Esta característica se puede utilizar para buscar biomarcadores tumorales específicos de metilación de ADN y para examinar biomarcadores de ADN candidatos para uso clínico. (10)

La metilación del ADN en la posición cinco del anillo de citosina se produce en la mayoría de los dinucleótidos CpG y ha sido reconocida como "la quinta base". La metilación del ADN está implicada en una variedad de procesos biológicos, incluyendo el desarrollo embrionario, la inactivación del cromosoma X, impronta genómica, la regulación de la expresión génica, y el mantenimiento de la memoria epigenética. El paso enzimático implicado utiliza S-adenosil-metionina (SAM) como un donante de metilo y se lleva a cabo por tres metiltransferasas de ADN, Dnmt1, Dnmt3a y Dnmt3b. Estas enzimas catalizan la adición covalente de un grupo metilo de un donante S-adenosil-metionina en la posición 5 del anillo de citosina, predominantemente en el dinucleótido CpG. (10) La hipermetilación del promotor Dnmt1 no se produce en gliomas de grado bajo, siendo observado principalmente en los glioblastomas secundarios. (11)

Además de la hipermetilación del promotor de ADN, la hipometilación del ADN es otro patrón importante de metilación alterado observado en el cáncer. (10, 12)

El creciente reconocimiento de la importancia de los cambios epigenéticos en la patogénesis del cáncer ha conducido a un cambio en los enfoques que se utilizan para identificar los genes afectados por este proceso. Los biomarcadores de metilación del ADN que se someten a cambios de metilación del ADN en la carcinogénesis, ofrecen una gama de oportunidades para la detección temprana, el diagnóstico, el pronóstico, la estratificación terapéutica y publicar la monitorización terapéutica del cáncer. La metilación del ADN tiene un gran potencial para ser utilizado como un biomarcador nucleico para evaluar el riesgo de cáncer, la detección temprana, el pronóstico y predicción de respuesta terapéutica. (10)

Los biomarcadores de metilación del ADN también puede predecir la respuesta a la quimioterapia; el mejor ejemplo es la hipermetilación del promotor de ADN en O6 metilguanina metiltransferasa (MGMT), una enzima de reparación del ADN, en el glioma. (10, 13)

El sitio más frecuente de alquilación en el ADN es la posición O6 de la guanina. El entrecruzamiento de ADN de doble cadena por agentes alquilantes es inhibida por la reparación del ADN celular mediante la proteína O6-metilguanina-ADN metiltransferasa también conocido como alquiltransferasa O6-alkylguanine-DNA. (12, 13, 14)

La metilación de MGMT se ha observado en 40-57% de los glioblastomas (12,16) sin embargo, subgrupos específicos tienen una frecuencia más alta. La metilación de MGMT se ha encontrado que es más frecuente en los glioblastomas secundarios, en las mujeres, y en los supervivientes a largo plazo, mientras que es poco frecuente (5%) en glioblastomas recurrentes. (12)

La hipermetilación en la región promotora del gen MGMT codifica la proteína de reparación del ADN O6-metilguanina-ADN metiltransferasa y es uno de los factores pronósticos más importantes para los pacientes con glioblastoma y predice la respuesta al tratamiento con agentes alquilantes como la temozolomida.

Los agentes alquilantes son moléculas altamente reactivas que causan la muerte celular mediante la unión a ADN. (12, 13, 15)

El tratamiento de glioblastomas con temozolomida (TMZ) introduce grupos alquilo en el ADN impidiendo su replicación. (12, 13)

Esta modificación estructural induce la muerte celular, sin embargo, las proteínas de reparación del ADN, tales como O6-alquilguanina DNA alquiltransferas, son capaces de eliminar aductos de alquilo de la posición O6 de la guanina y prevenir la muerte celular inducida por TMZ. (13)

Sin embargo, cuando el promotor de MGMT está metilado, el gen MGMT no se transcribe y por lo tanto no puede reparar el daño del ADN causado por TMZ, haciendo más eficiente el uso de TMZ. (12)

El estado de metilación de la O6-metilguanina-ADN metiltransferasa (MGMT) es un importante biomarcador predictivo de beneficio de terapia con fármacos alquilantes en glioblastoma. (16)

La proteína MGMT rápidamente revierte la alquilación en la posición O6 de la guanina, evitando así la formación de enlaces cruzados letales. A través de este mecanismo, MGMT causa resistencia a fármacos alquilantes. (14)

MGMT protege a las células contra la mutación mediante la eliminación por grupos alquilo de bases de guanina, que son introducidos por agentes de alquilación tales como nitrosamidas. (10)

El gen MGMT está localizado en el cromosoma 10q26 y codifica una proteína de reparación del ADN que elimina grupos alquilo de la posición O6 de la guanina, un importante sitio de alquilación de DNA. (17, 18)

El nivel de MGMT varía ampliamente de acuerdo con el tipo de tumor, e incluso varía entre los tumores del mismo tipo. Por ejemplo, aproximadamente el 30 por ciento de los gliomas carecen de MGMT. Esta deficiencia de la enzima puede

aumentar la sensibilidad de los tumores cerebrales a los agentes alquilantes. Debido a que el gen MGMT no es comúnmente mutado o suprimido, una falta de MGMT pueden ser causados por cambios que no alteren la información genética de la célula. La metilación del ADN es el tipo principal de tales modificaciones epigenéticas en los seres humanos, y que desempeña un papel importante en la tumorigénesis. En la metilación particular de sitios normalmente no metiladas CpG, conocidas como islas (citidina fosfato de guanosina), en las regiones promotoras de genes supresores de tumores y la reparación de ADN se correlaciona con la pérdida de la expresión de estos genes en líneas celulares de cáncer y tumores primarios. La metilación de la isla CpG en el gen MGMT evita la transcripción del gen. (15)

El silenciamiento epigenético del gen MGMT (O6-metilguanina-ADN metiltransferasa) por el promotor de metilación se ha asociado con una supervivencia global más alta en pacientes con glioblastoma que, además de la radioterapia, han recibido quimioterapia alquilante con carmustina o temozolomida. (14)

Los altos niveles de actividad de MGMT en las células cancerosas crean un fenotipo resistente por embotamiento del efecto terapéutico de los agentes alquilantes y puede ser un determinante importante de fracaso del tratamiento. El silenciamiento epigenético del gen MGMT por metilación del promotor está asociado con la pérdida de la expresión de MGMT y disminución de la actividad de reparación del ADN. (14) Por lo tanto, el estado de hipermetilación del promotor de la MGMT se asocia con mayor sensibilidad a agentes alquilantes tales como carmustina y temozolamida y a la radioterapia en pacientes. En el curso del desarrollo del tumor, el silenciamiento génico por metilación del ADN es un mecanismo temprano e importante mediante el cual genes supresores de tumores se inactivan. (10)

En un estudio fase 2 se evaluó radioterapia combinada y temozolomida para glioblastoma de recién diagnóstico, se encontró que la metilación del promotor MGMT en el tumor estaba asociado con una mayor supervivencia. En el grupo de

pacientes cuyos tumores contenían un promotor MGMT metilado, los que recibieron temozolomida y radioterapia tuvieron una mediana de supervivencia libre de progresión de 10,3 meses, en comparación con 5,9 meses para los pacientes que recibieron radioterapia sola. Entre los pacientes cuyos tumores contenían un promotor MGMT no metilado, los que recibieron temozolomida y radioterapia tuvieron una mediana de supervivencia libre de progresión de 5,3 meses, en comparación con 4,4 meses para los pacientes que fueron tratados con radioterapia sola. Se encontró que la metilación del promotor MGMT se asocia con un resultado favorable después de la quimioterapia temozolomida en pacientes con diagnóstico reciente de glioblastoma. (14)

Se realizó un estudio retrospectivo de 219 glioblastomas (GBM) tratados con varias modalidades terapéuticas y se observó que la metilación de MGMT no tuvo impacto en la supervivencia, pero mostró una ventaja significativa (17,1 meses frente a 13,1) en los pacientes tratados con RT y quimioterapia adyuvante, sobre todo cuando los pacientes recibieron quimioterapia durante el curso de la radioterapia (19,9 meses frente a 12,5). Esto sugiere que el impacto pronóstico de la metilación del gen MGMT depende de las modalidades terapéuticas y horarios. (17)

La metilación de MGMT no se correlacionó con las principales alteraciones moleculares, tales como la pérdida de 10q y la expresión de p53. (17)

Aunque el silenciamiento epigenético del promotor del gen MGMT se ha asociado con una supervivencia prolongada en pacientes con glioblastoma, existe una gran controversia sobre su uso como un marcador pronóstico en la respuesta a la temozolamida de pacientes con diagnóstico reciente de glioblastoma. (12, 19)

La metilación de MGMT también se asocia con pseudo-progresión después de radioquimioterapia concomitante para pacientes con glioblastoma recién diagnosticados. Además, el patrón de repetición, incluyendo el tiempo hasta la recidiva y la ubicación del tumor recurrente, parece estar correlacionado con el estado de metilación del MGMT del tumor primario. (12, 20)

JUSTIFICACION

Al momento actual la sobrevida de los niños con astrocitomas no rebasa el 60% a 5 años por lo cual se requiere profundizar en el estudio del comportamiento biológico y molecular de éstos tumores para poder dar un tratamiento más adecuado.

Los agentes alquilantes son en la actualidad de las drogas de primera línea en el tratamiento de los tumores cerebrales, que como recordaremos son el tipo de neoplasia sólida más frecuente en la edad pediátrica, con un comportamiento biológico que difiere al de la edad adulta. La temozolamida es un agente alquilante de segunda generación con la habilidad de difusión en el sistema nervioso central (SNC) con toxicidad relativamente menor que la de otros agentes alquilantes como la dacarbazina, lo cual justifica su amplio uso en pediatría.

Conocer la expresión de MGMT nos permitirá conocer el pronóstico de la respuesta al tratamiento y sobrevida de los pacientes pediátricos con astrocitomas, ya que ha sido bien demostrado que la sobreexpresión de MGMT se relaciona con el aumento en la reparación del daño inducido por alquilantes al DNA, lo cual confiere mayor agresividad y mala respuesta al tratamiento.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Mismos tratamientos producen una respuesta tumoral muy diversa en cada uno de los niños con tumor cerebral, en especial astrocitomas, por lo cual se requiere conocer a fondo cual es el comportamiento de cada uno de ellos y cómo influye en su respuesta a tratamientos considerados como de elección para éstos pacientes, y si la expresión aumentada de la MGMT tiene relación con la respuesta al tratamiento con temozolamida y sobrevida de los niños con astrocitomas de alto grado.

¿Existe asociación entre la sobreexpresión de MGMT con la respuesta al tratamiento y sobrevida de los niños con astrocitomas tratados con temozolamida?

HIPOTESIS

La sobreexpresión de MGMT se asociará con una sobrevida 40% menor a un año comparado con el grupo de pacientes pediátricos con astrocitomas que no la presentan.

OBJETIVOS

General.

Determinar la asociación entre la sobreexpresión de MGMT con la respuesta al tratamiento con temozolamida y sobrevida de los niños con tumores cerebrales tipo astrocitomas.

MATERIAL Y METODOS

Lugar de realización del estudio. Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional SXXI. Servicio de Oncología, laboratorio de investigación de Tumores del Sistema Nervioso Central

Diseño del estudio.

Tipo de estudio: cohorte histórica o retrospectiva

Número de mediciones: longitudinal

Por tipo de maniobra: analítica

Temporalidad: retrospectivo

Periodo de estudio.

Se incluyeron a todos los pacientes pediátricos con diagnóstico de astrocitoma tratados con temozolamida en el periodo comprendido entre el 1° de Enero del 2008 al 31° de Diciembre de 2012 en el servicio de Oncología Pediátrica de la UMAE Pediatría del CMN SXXI.

Población de estudio.

Se incluyeron los pacientes con astrocitomas tratados con temozolamida diagnosticados en el servicio de Oncología Pediátrica de la UMAE CMN SXXI y tratados en el servicio.

Criterios de inclusión

1. Pacientes de cualquier sexo (hombre o mujer) con el diagnóstico de astrocitoma diagnosticado en el servicio de Patología del Hospital del Centro Médico Nacional SXXI en el periodo comprendido del estudio.
2. Pacientes que cuenten con expediente completo que permita la adecuada recolección de datos.
3. Pacientes que cuenten con bloque de parafina del tumor en estudio
4. Pacientes que hayan recibido manejo con temozolamida
5. Pacientes que tengan seguimiento de por lo menos seis meses para poder evaluar la respuesta tumoral y sobrevida.

Criterios de exclusión

1. Pacientes que iniciaron manejo en otra institución.

Criterios de eliminación

1. Todos aquellos casos con daño tisular por problemas de fijación o almacenamiento.

FACTIBILIDAD

Se cuenta con los recursos humanos para realizar este estudio.

- Para cada paciente con diagnóstico de astrocitoma de alto grado con expediente clínico completo y bloque de parafina.
- Médico subespecialista en Oncología Pediátrica.
- Médico Oncólogo Pediatra tutor del estudio.
- Laboratorio de investigación para realizar inmunohistoquímica.

DEFINICION DE VARIABLES

Variables independientes.

Expresión de MGMT.

Definición conceptual: La MGMT es una enzima de reparación del DNA que revierte la alquilación del DNA causando resistencia a los fármacos alquilantes.

Definición operacional: sobreexpresión de la MGMT evaluada por inmunohistoquímica.

Escala de medición: cualitativa

Unidades de medición: sobreexpresada o no sobreexpresada

Variables dependientes.

Edad.

Definición conceptual: Espacio de años que han pasado entre el nacimiento y el momento actual.

Definición operacional. Edad en años y meses en el momento de la atención.

Tipo de variable: Cuantitativa.

Escala de medición: Continua

Unidad de medición: años y meses.

Sexo.

Definición conceptual: Condición orgánica, masculina o femenina, de los animales y las plantas. Características sexuales fenotípicas.

Definición operacional: A partir de la exploración física las características fenotípicas

Tipo de variable: Cualitativa

Escala de medición: Dicotómica, nominal

Unidad de medición: femenino/ masculino

Resección tumoral

Definición conceptual: Operación que consiste en separar el todo o parte de uno o más órganos.

Definición operacional: Grado de resección del tumor, reportado por el neurocirujano en la hoja posquirúrgica.

Escala de Medición: dicotómica.

Unidades de medición: parcial o completa.

Localización anatómica del astrocitoma.

Definición conceptual: Lugar en el que aparecen en el parénquima cerebral.

Definición operacional: Localización anatómica de los astrocitomas.

Escala de Medición: Cualitativa

Unidades de medición: supratentoriales, infratentoriales y espinales (intramedular y extramedular).

Histología del astrocitoma

Definición conceptual: características histopatológicas como celularidad, atipia nuclear índice mitótico proliferación microvascular y necrosis de acuerdo a la clasificación de la OMS.

Definición operacional: Grado III: Astrocitoma anaplásico, Gliomatosis cerebri, Xantoastrocitoma pleomorfo anaplásico, Oligoastrocitoma anaplásico, Oligodendroglioma anaplásico. Grado IV: Glioblastoma, Gliosarcoma, Glioblastoma de células gigantes.

Escala de medición: Cualitativa

Unidades de medición: Grado I, II, III, IV

VARIABLES DE CONFUSIÓN

Radioterapia:

Definición conceptual: Disciplina médica que hace uso de las radiaciones ionizantes con fines terapéuticos, administrando una dosis de radiación letal sobre la lesión.

Definición operacional: Radioterapia recibida posterior al 4 ciclo de QT de acuerdo al protocolo de tratamiento. Escala de Medición: dicotómica.

Unidades de medición: Si la ha recibido, o no la ha recibido.

METODOLOGÍA

El presente estudio se encuentra dentro de los lineamientos del reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación publicada en el diario oficial de la federación el 7 de febrero de 1984, el instructivo de operación de la comisión de investigación científica y de los comités locales de investigación del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Con la declaración de Helsinki y su modificación en 1975, Venecia en 1983 y Hong Kong en 1989; para los trabajos de investigación biomédica en humanos.

En este estudio se revisaron las muestras de tejido obtenidas por resección tumoral de los pacientes diagnosticados con astrocitoma y sus expedientes clínicos en forma retrospectiva por lo que no fue necesario el consentimiento informado, sin embargo se guardó el anonimato y la confidencialidad a que el paciente tiene derecho.

Se revisaron los expedientes de todos los pacientes menores de 17 años con astrocitoma diagnosticados en el Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI en el periodo del 1 de enero del 2008 al 31 de diciembre del 2012.

Se llenó la hoja de recolección de datos, posteriormente se solicitaron al servicio de patología los bloques de parafina y se realizó la técnica de inmunohistoquímica para la determinación de MGMT (MT 3.1) de la siguiente manera:

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

Inmunohistoquímica:

Para el estudio de inmunohistoquímica se realizó con sistema peroxidasa-antiperoxidasa por un biólogo capacitado en la técnica de acuerdo a las recomendaciones de los proveedores.

Se realizaron cortes de 3 a 4 μ m de tejido incluido en parafina, previamente fijado en formol amortiguado al 10%, utilizando porta objetos con poly-L lysina. (0.1% en agua destilada). El tejido se desparafino en la estufa a 56° C durante 30 minutos y rehidratándose desde xilol hasta agua destilada pasando por alcoholes a concentraciones menores (5 minutos en cada uno de las soluciones).

Posteriormente se efectuó la recuperación antigénica con DAKO target retrieval solution al 10% durante 10 minutos en olla express. Una vez que se enfrió (temperatura ambiente) se retirará del recuperador y se enjuaga con agua destilada ó PBS. La peroxidasa se bloquea por 10 minutos con DAKO peroxidase blocking al 3% (se debe mantener cubierto para evitar el contacto con la luz) y se lava con agua destilada ó PBS.

Los cortes fueron incubados en cámara húmeda durante 20 minutos con los anticuerpos primarios: Anti MGMT (1:50 GeneTex corporation, Anticuerpo monoclonal de ratón, anti-MGMT, Clona MT 3.1, N° de catálogo G-TX23144).

El anticuerpo primario fue detectado con un anticuerpo secundario biotinilado. Una vez aplicado, se incubará durante 30 minutos streptavidina conjugada (peroxidasa de rábano). Posteriormente se revelará con el cromógeno diaminobencidina (DAB) por 5 minutos y finalmente será contrastado con hematoxilina.

El tejido fue deshidratado con alcoholes de menor a mayor concentración (70%, 90% y 100%) y xilol. Las preparaciones se montaran con resinas.

En cada caso se incluyó un control positivo conocido, para el anticuerpo MGMT en el que se utilizó muestra de carcinoma de mama. Cabe señalar que la calidad del tejido fue evaluado con la expresión del Ki-67, marcador que debe ser positivo en todos los astrocitomas en menor o mayor grado, sin excepción. Por lo cual el hecho de que un espécimen no salga positivo nos indicó la mala preservación del tejido, evitando de esta manera falsos negativos.

TAMAÑO DE LA MUESTRA:

El muestreo será de tipo no probabilístico de casos consecutivos. Se incluirán a todos los pacientes con diagnóstico de astrocitomas por patología, que cuenten con bloques de parafina en el periodo comprendido de Enero de 2008 a Diciembre de 2012.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico descriptivo se realizó con porcentajes, frecuencias y otras medidas de tendencia central. Estudios paramétricos o no paramétricos evaluando en el número de células positivas a la expresión del anticuerpo MGMT

Para el análisis de la asociación de la expresión del anticuerpo con las diferentes variables se realizó Chi cuadrada y OR. Para estimar la sobrevida se aplicaron curvas de Kaplan-Meier y las comparaciones entre grupos fueron evaluados mediante prueba de log-rank.. Se considero significativo con un alfa de 0.05 y poder del 80%. Los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa SPSS versión 20.0.

RESULTADOS

Este estudio se realizó en HP CMN SXXI donde se incluyeron 24 pacientes: 13 (54.2%) sexo femenino y 11 (45.8%) sexo masculino. La mediana de edad es de 8.5 años con una mínima de 2 años de edad y máxima de 16 años.

Histológicamente se observa que los astrocitomas de bajo grado corresponden a 19 casos (79%). No hubo diferencia en frecuencia en cuanto lesiones infratentoriales e supratentoriales. El tratamiento quirúrgico en 14 pacientes (58.3%) con resección del 100 % de la lesión, los restantes tuvieron resección parcial. En cuanto esquemas de quimioterapia 18 pacientes (75%) recibieron esquema ICE (ifosfamida, carboplatino y VP16)–TMZ (Temozolamida) el resto se aplicó esquemas alternos por presentar progresión tumoral.

En 10/24 pacientes mostraron progresión tumoral (41.7%). Fallecieron un total de 6 pacientes (25%) con un seguimiento máximo de 60 meses. Tabla 1

Actualmente están libres de enfermedad 14/24 (58.3%). No existió ninguna defunción por toxicidad a la quimioterapia o por eventos adversos.

En análisis interferencial La progresión tumoral resultó significativa para la sobrevida ($p= 0.021$) con un OR de 7 (IC 95% 0.959-51.094). El sexo, la edad, la histología y la localización no resultaron estadísticamente significativos para la sobrevida.

En la resección tumoral se observó significancia clínica para la sobrevida observando 2 muertes (14.2%) en 14 resecciones completas y 4 muertes (40%) en 10 resecciones parciales.

TABLA 1. Características de los pacientes.

		n	%	Rango
Sexo	Mujeres	13	54.2%	
	Hombres	11	45.8%	
Edad (años)	Mediana: 8.5 años			2-16 años
Vivos		18	75%	
Muertos		6	25%	
Localización:				
⌚	Supratentorial:	11	45.8%	
⌚	Infratentorial:	11	45.8%	
⌚	Medular:	2	8.3%	
Dx Histológico:				
⌚	Astrocitoma pilocítico:	5	20.8%	
⌚	Astrocitoma fibrilar:	14	58.3%	
⌚	Astrocitoma anaplásico:	3	12.5%	
⌚	Glioblastoma multiforme:	2	8.3%	
Progresión tumoral:				
⌚	Positiva:	10	41.7%	
⌚	Negativa:	14	58.3%	
Radioterapia:				
⌚	Si:	13	54.2%	
⌚	No:	11	45.8%	
Dosis de RT:				
⌚	54Gy:	6	25%	
⌚	>54Gy:	5	20.8%	
⌚	<54Gy:	2	8.3%	
⌚	No:	11	45.8%	
Resección quirúrgica:				
⌚	Completa:	14	58.3%	
⌚	Parcial:	10	41.7%	

Al realizar modelo de regresión logística se encontró que la variable que persistió con significancia estadística fue la presencia de progresión tumoral, en cuanto significancia clínica fue la presencia de resección quirúrgica completa. (Tabla 2)

Tabla 2. Coeficientes

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	Sig.
	B	Error típ.	Beta		
(Constante)	2.314	1.065		2.172	0.046
Resección tumoral	0.152	0.204	0.173	0.748	0.466
Progresión tumoral	-0.646	0.250	-0.736	-2.586	0.021
Histología	-0.031	0.143	-0.058	-0.216	0.832
Localización	-0.168	0.133	-0.245	-1.263	0.226
Radioterapia	0.295	0.183	0.340	1.613	0.128
Sexo	-0.104	0.177	-0.120	-0.588	0.565
MGMT final	0.185	0.250	0.185	0.740	0.470
Edad	-0.279	0.269	-0.213	-1.037	0.316

Tabla 3. Progresión tumoral asociado con la sobrevida en pacientes con Astrocitoma

	Total	Sin progresión	Con progresión	Muertos
MGMT (-)	18 (75%)	13	5	2
MGMT (+)	6 (25%)	1	5	2

Tabla 4. Características de los pacientes positivos a MGMT

Caso	Edad	Sexo	Localización	Histología	Resección	Estado actual	Progresión
1	8 a	Femenino	Supratentorial	Astrocitoma fibrilar	Parcial	Fallecida	Si
2	4 a	Femenino	Supratentorial	Astrocitoma anaplásico	Parcial	Fallecida	Si
3	16 a	Femenino	Holomedular	Astrocitoma fibrilar	Parcial	Viva	Si
4	6 a	Femenino	Supratentorial	Astrocitoma pilocítico	Completa	Viva	No
5	12 a	Masculino	Medular	Glioma mixto	Parcial	Vivo	Si
6	7 a	Femenino	Supratentorial	Astrocitoma anaplásico	Parcial	Vivo	Si

En cuanto a la expresión de MGMT 6/24 resultaron positivos (25%). De estos, 5 pacientes presentaron en algún momento de la evolución progresión tumoral. Se reportan 2 muertes (33.3%) y 4 permanecen vivos al cierre del estudio (66.6%) sin presentar significancia estadística ($p=0.296$). El OR para fallecer si la MGMT es positiva es de 1.5 (IC 95% 0.361-6.230). Tabla 4

La sobrevida global fue de 72.6 % a 60 meses de seguimiento, con una media de sobrevida de 53.6 meses (IC95%=42.5- 64.8) (fig-1)

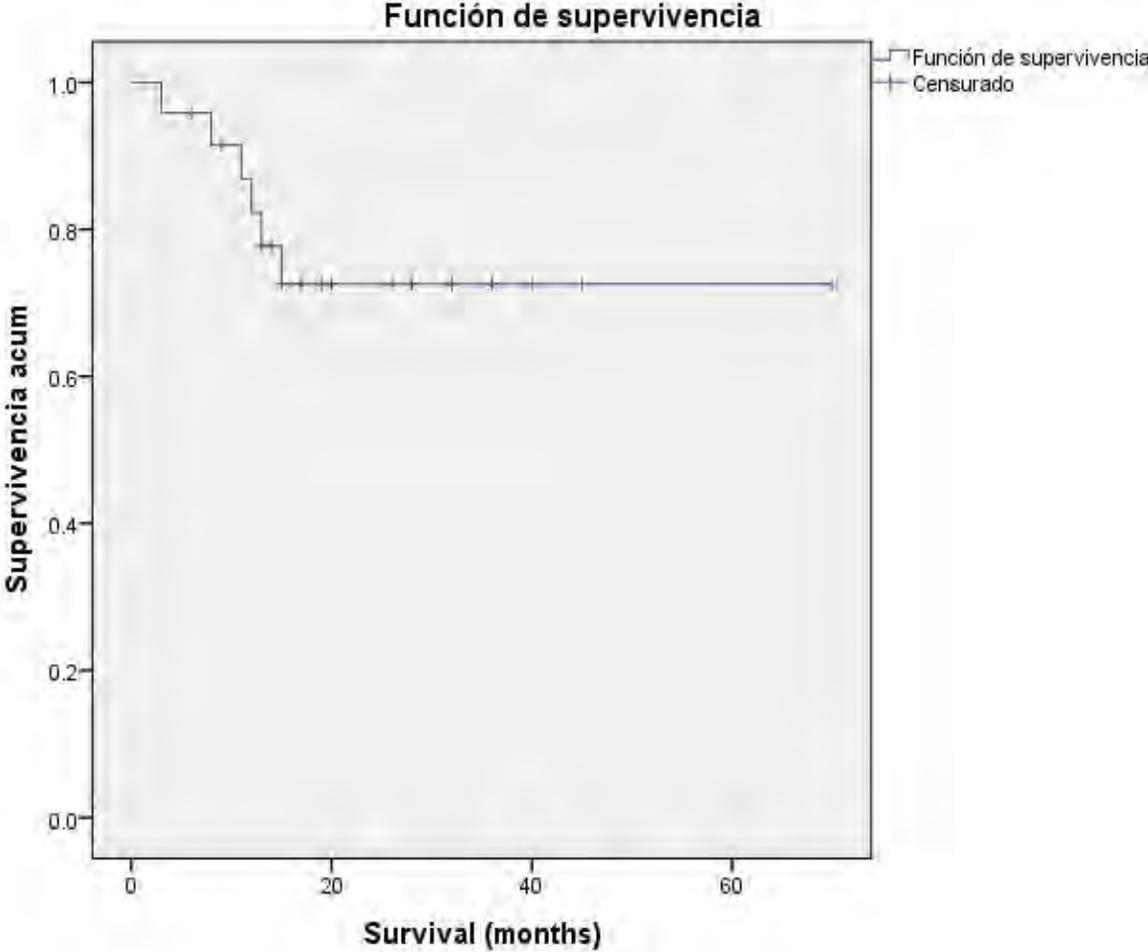


Fig. 1

Se realizaron curvas de sobrevivencia a 60 meses de acuerdo a género donde los pacientes femeninos tuvieron una sobrevivencia de 63.3% comparada con aquellos de sexo masculino la cual fue de 81.8% ($p=0.69$). Con una media en pacientes femeninos del 29.3% y pacientes masculinos del 59%. (fig-2)

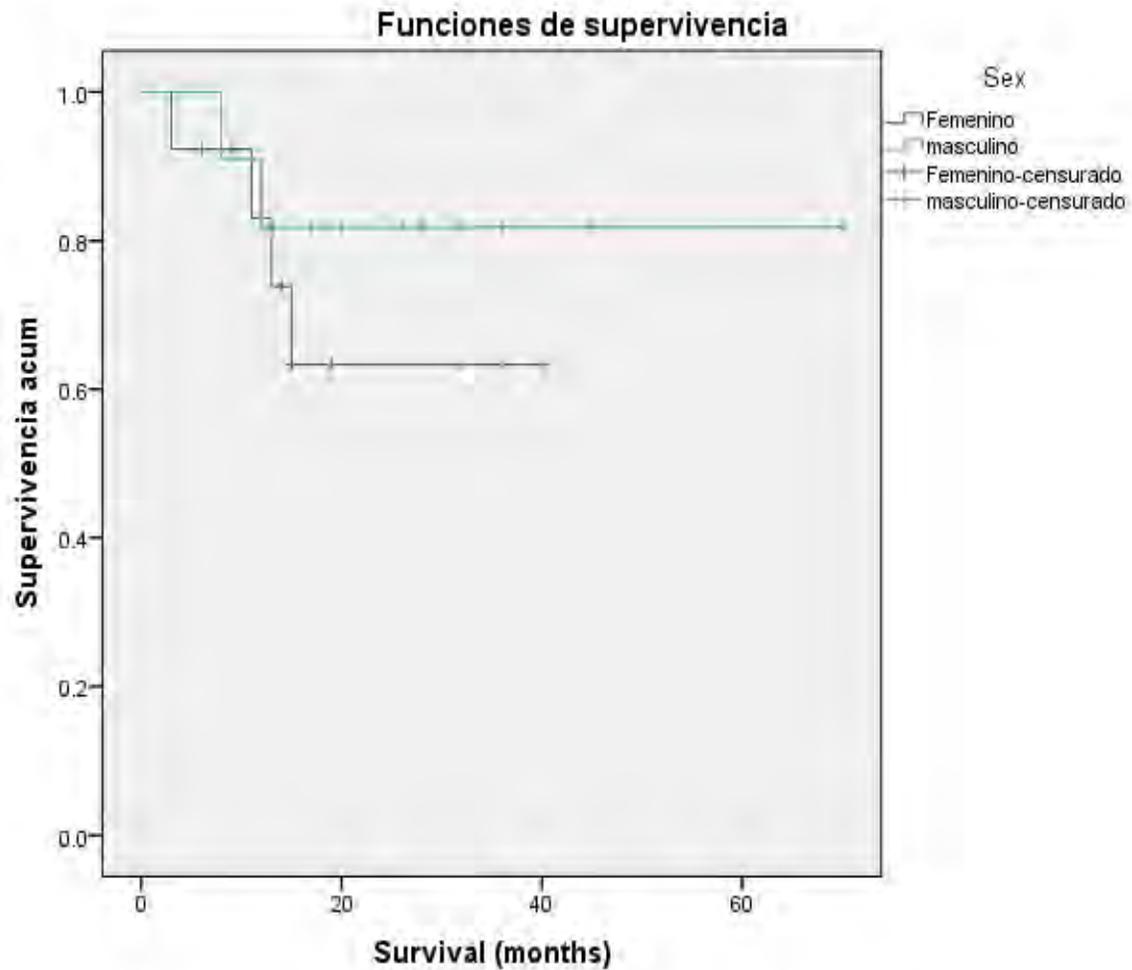


Fig. 2

De acuerdo al diagnóstico histopatológico encontramos que los pacientes con astrocitoma fibrilar presentan 69.6 % de sobrevivida a 60 meses mientras que el astrocitoma anaplásico presenta una sobrevivida del 0% a 60 meses. (fig 3).

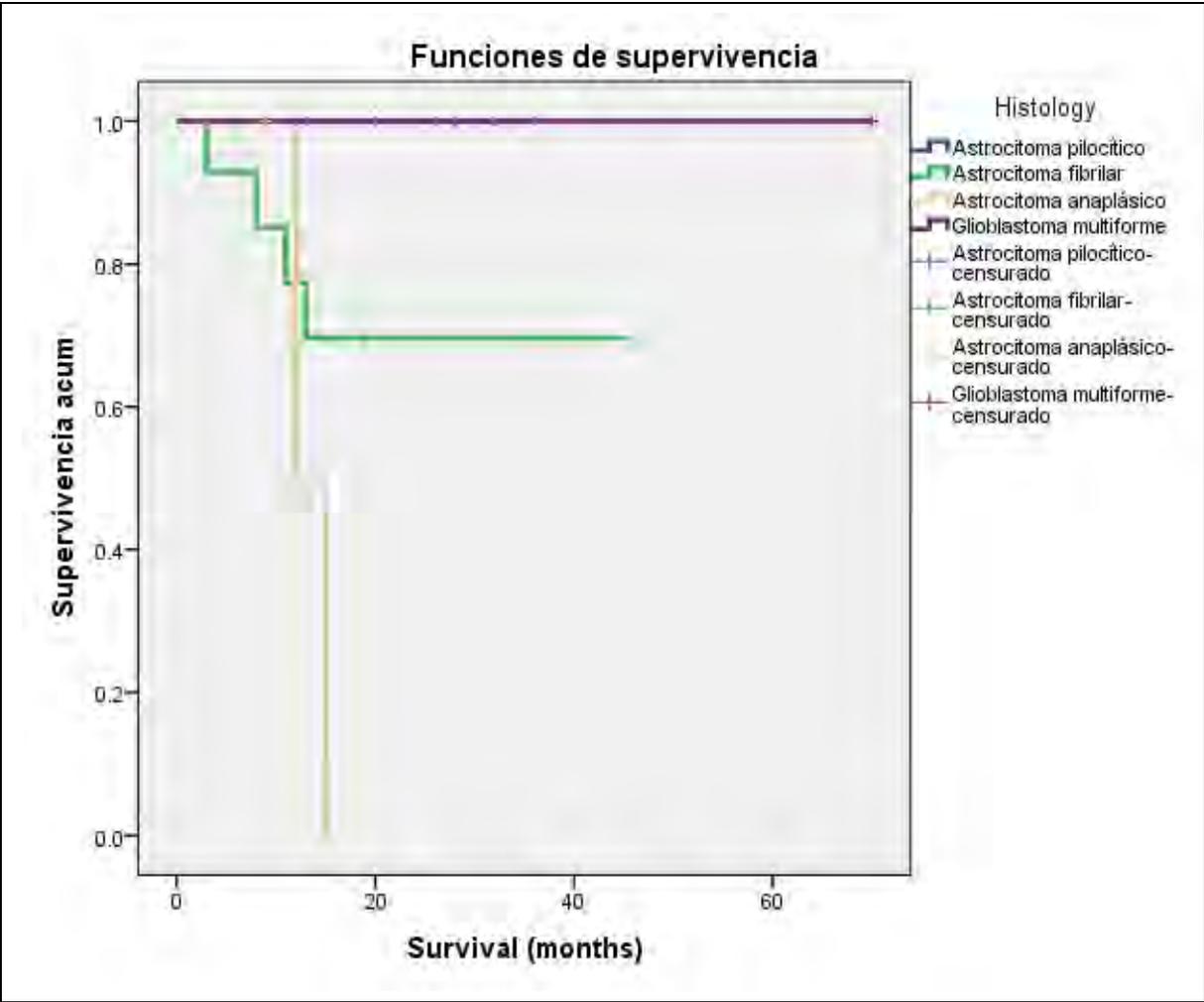
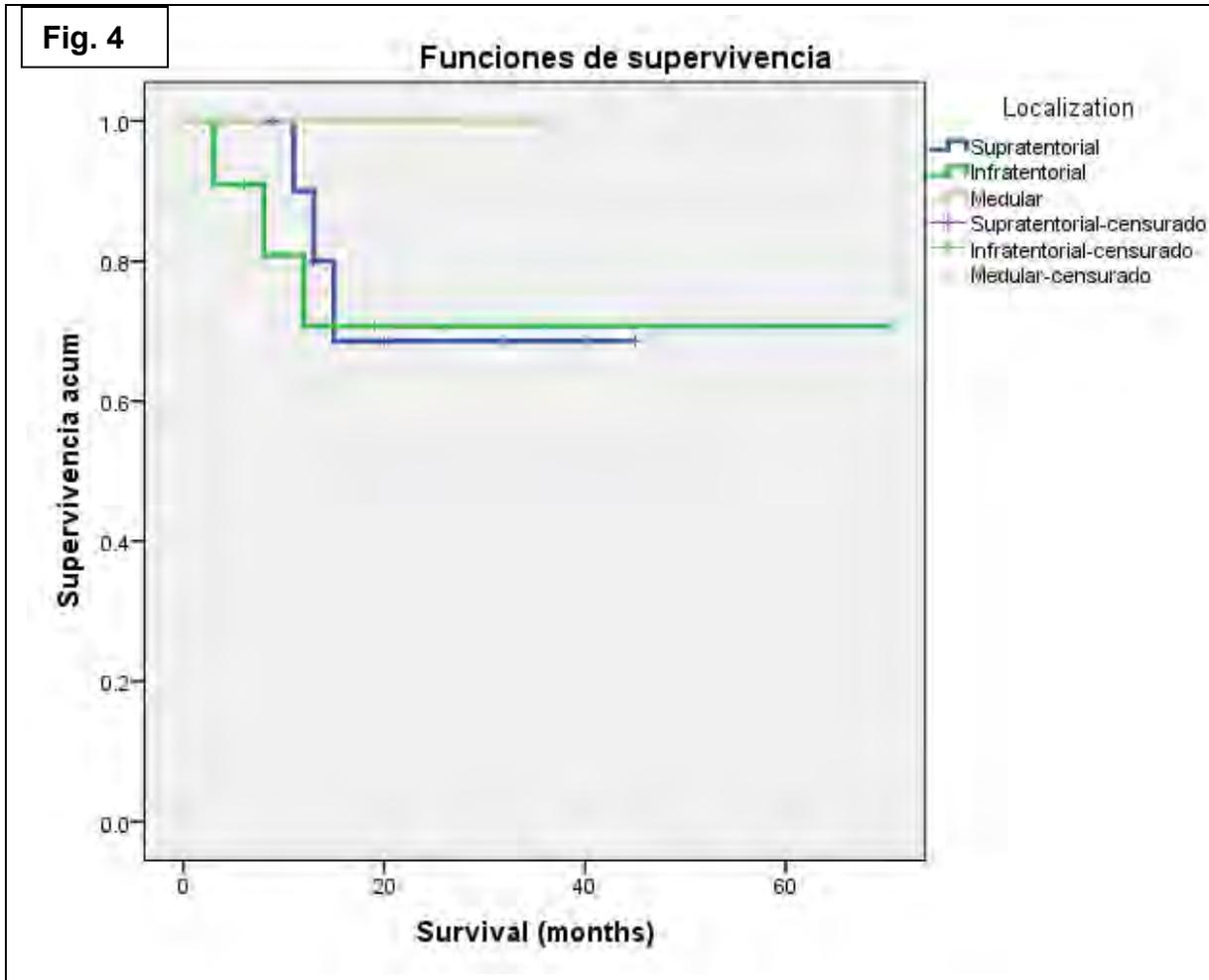


Fig. 3

La sobrevida de acuerdo a la localización los pacientes que presentaron localización supratentorial tienen sobrevida de 68.6% a 60 meses, pacientes con tumoración infratentorial presentan sobrevida de 70.7 % a 60 meses mientras que los pacientes con tumoración medular mostraron sobrevida de 100 %. (LogRT: 0.740). (fig 4)



De acuerdo a la presencia de progresión tumoral la sobrevivida para aquellos con progresión fue de 45.7% a 60 meses vs aquellos sin progresión 92.3% a 60 meses. (fig 5).

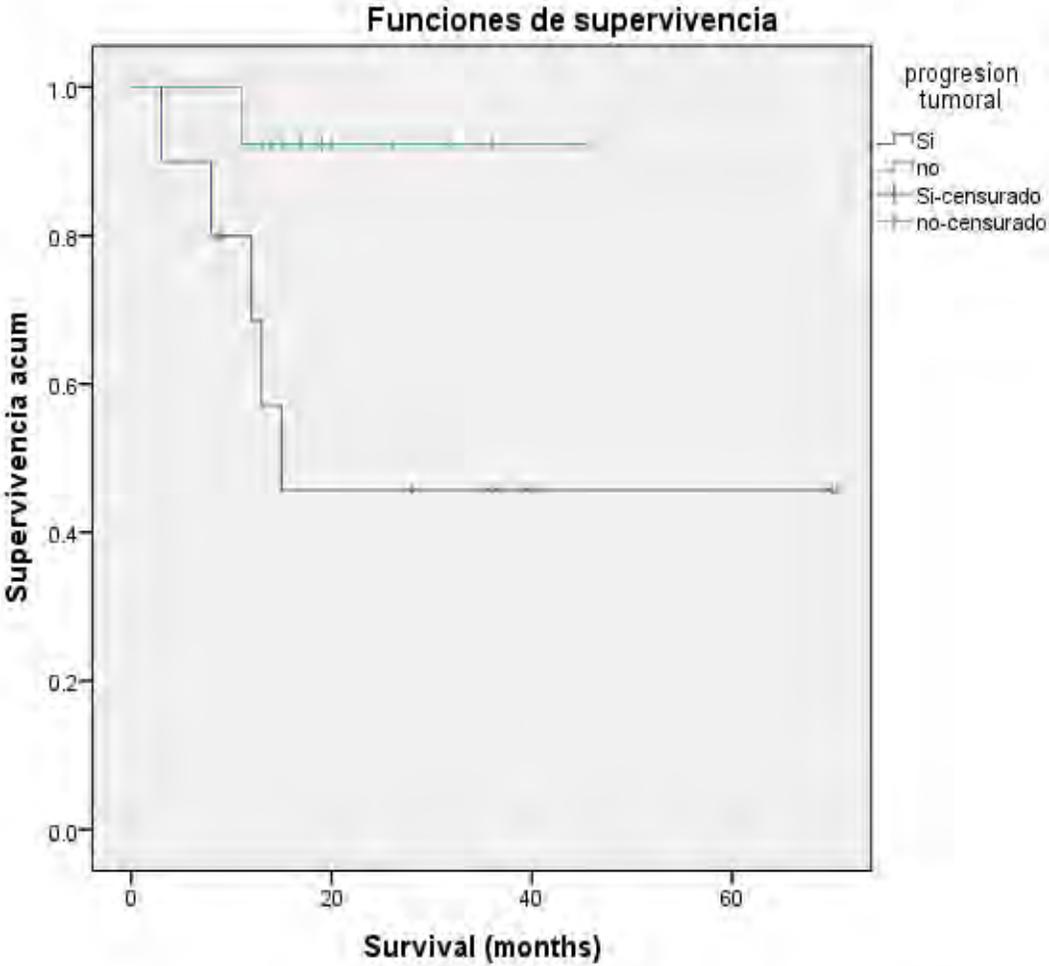


Fig. 5

En cuanto a los pacientes que recibieron tratamiento con esquema de QT con ICE-TMZ tuvieron una sobrevida de 67.8% a 60 meses, mientras que los que tuvieron esquema de QT con Carboplatino-VCR-TMZ tuvieron una sobrevida de 75% a 60 meses. (LogRT: 0.709).(Fig. 6)

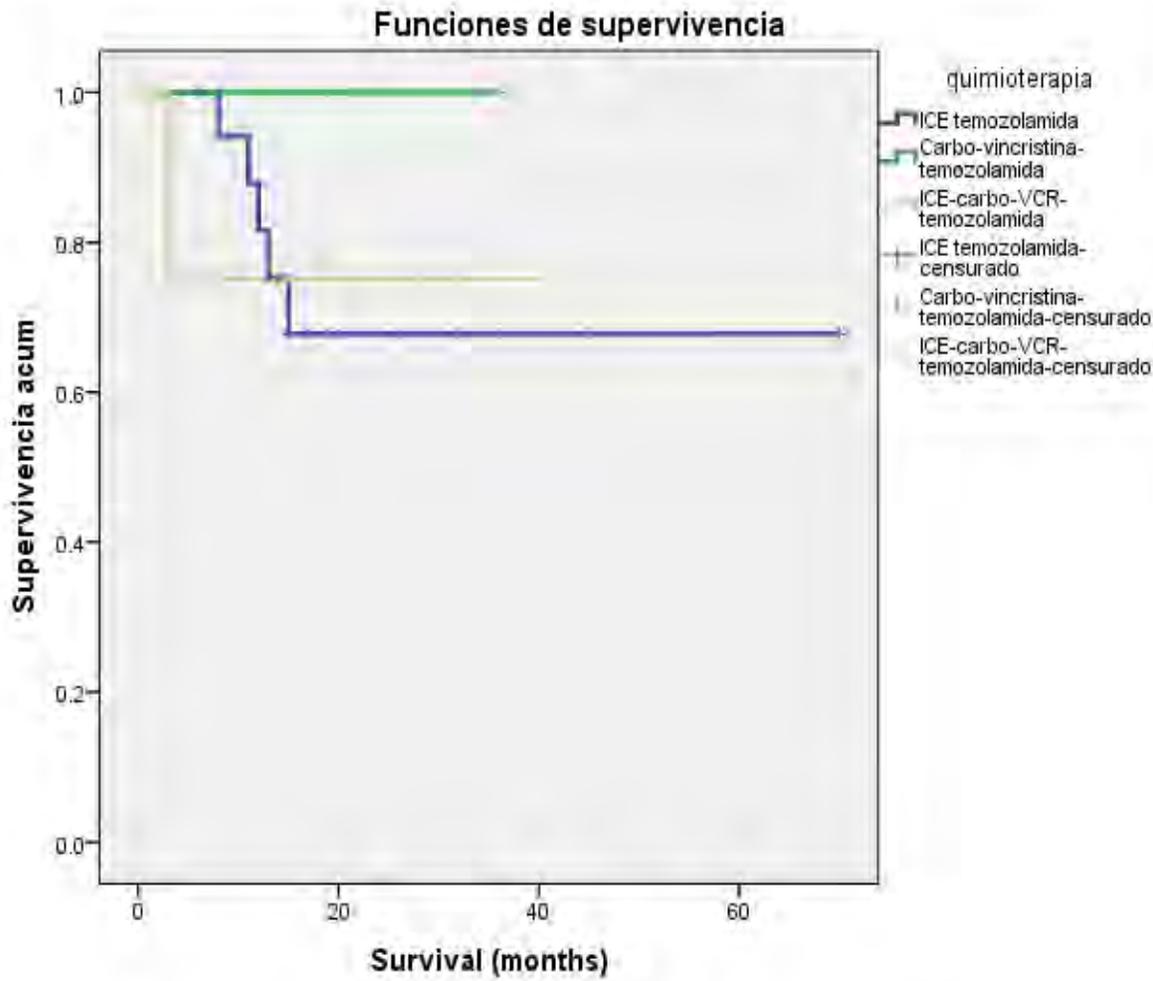


Fig. 6

La sobrevida en pacientes que tuvieron resección completa fue de 84.5% a 60 meses, mientras que los pacientes con resección parcial presentaron una sobrevida a 60 meses del 56%. (fig 7)

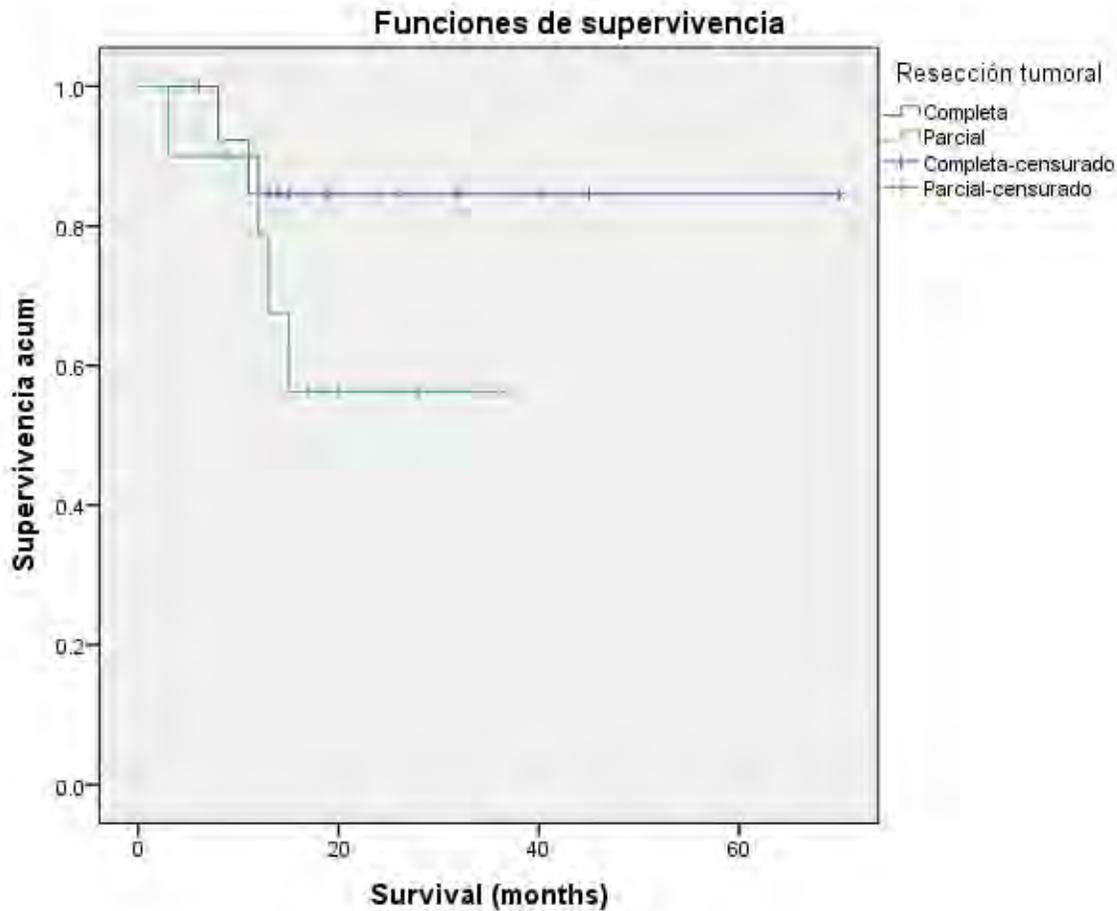


Fig. 7

Los pacientes que recibieron RT muestran sobrevida de 83% a 60 meses mientras que los pacientes que no recibieron RT tienen sobrevida de 60 % a 60 meses. (Fig. 8)

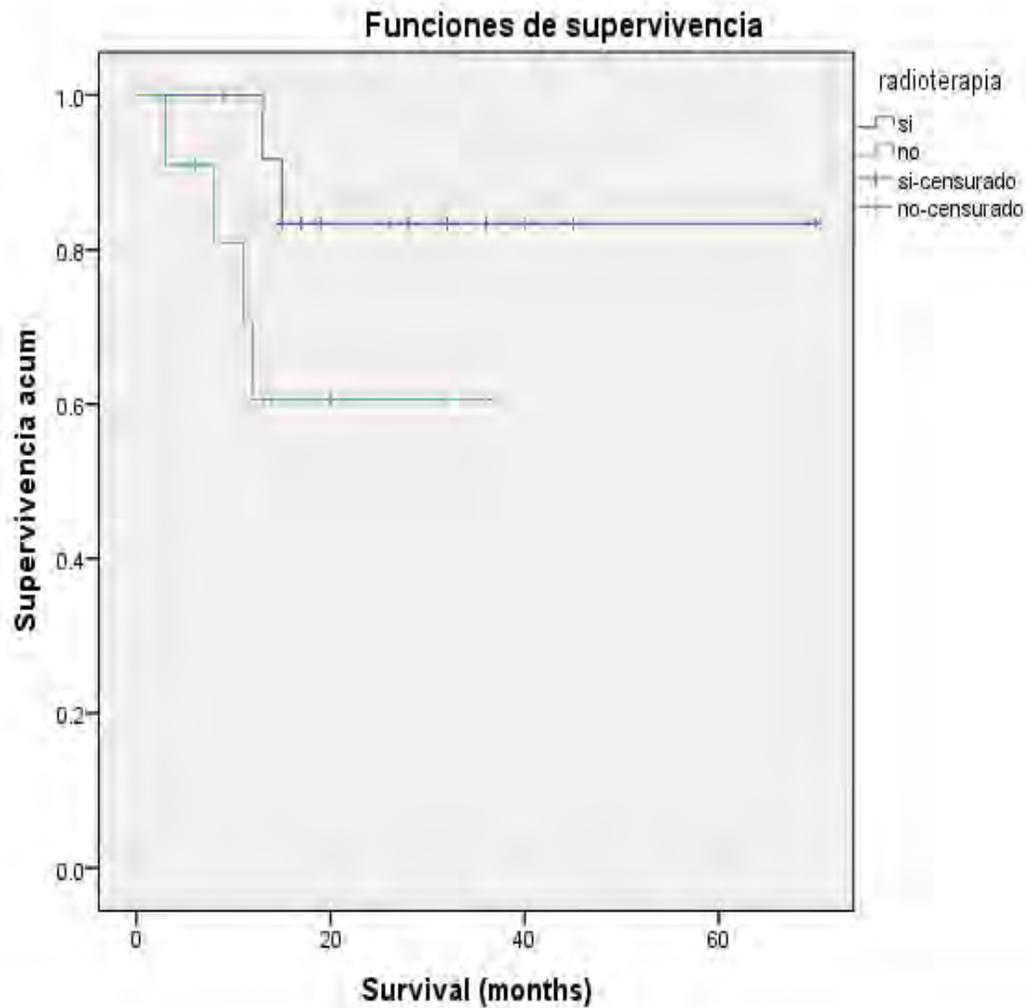


Fig. 8

La sobrevida en pacientes que fueron MGMT positivos fue de 60 % a 60 meses, mientras que los pacientes negativos a MGMT tuvieron una sobrevida de 76.7% a 60 meses. Los positivos con una media de 27 meses y los negativos con una media de 55.7 meses. (LRT: 0.151%). (Fig.: 9)

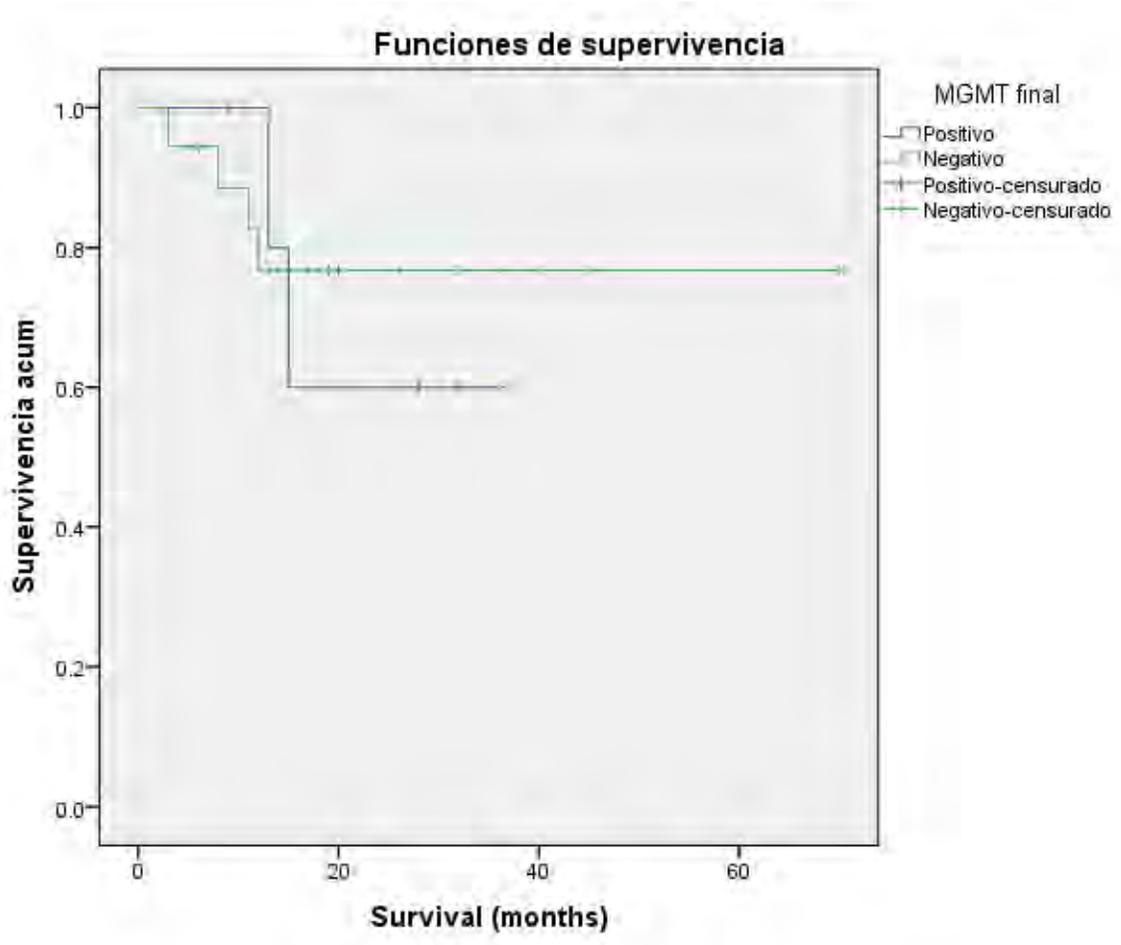


Fig. 9

DISCUSIÓN

Los tumores cerebrales son el tipo de tumor sólido más frecuente en la edad pediátrica. A pesar de ello, pocos avances se han logrado en los últimos 40 años, por lo que es necesario profundizar en el conocimiento del comportamiento biológico de estos tumores para poder plantear una estrategia terapéutica dirigida que pueda mejorar la sobrevida de estos pacientes. El comportamiento biológico de estos tumores ha mostrado que neoplasias con características histológicas similares pueden tener un comportamiento clínico diferente que varía de un niño a otro e incluso diferente dependiendo de la localización del tumor. En los últimos 20 años, podemos decir que gracias a la investigación exclusivamente clínica en éstos pacientes, se ha podido incrementar la sobrevida de los niños con un astrocitoma de alto grado de 17% a 65% hasta cinco años. (7)

La supervivencia media de los pacientes con astrocitomas según la clasificación de la OMS es de 5 a 7 años para los grado I de 2.5 a tres años para el grado II de 1.5 a dos años para el grado III y de un año o menos para el grado IV. (21)

El tratamiento al momento actual es multidisciplinario, inicialmente con neurocirugía, quimioterapia neoadyuvante, y radioterapia. (22) Tradicionalmente el riesgo y por ende, el tratamiento de los pacientes se basa de acuerdo a tres parámetros; clínicos (extensión de la enfermedad, diseminación a neuroeje), histológicos (grado de malignidad de la OMS) y parámetros radiológicos (estructuras involucradas, residual tumoral). Sin embargo, en los últimos años se han agregado tres parámetros más, fundamentales para poder comprender la biología molecular de estos tumores y poder ofrecer un tratamiento más adecuado: parámetros inmunohistoquímicos, parámetros genéticos-epigenéticos, y parámetros biológicos. Los avances en las técnicas de diagnóstico molecular han permitido al clínico establecer factores pronósticos para cada paciente y de este modo poder ofrecerle el mejor tratamiento posible de acuerdo a la características histológicas, biológicas y moleculares de cada tumor. (23). Con base en lo comentado, es evidente que el plantear una estrategia terapéutica para un niño con un tumor cerebral va mucho más allá de la simplicidad de una

valoración sustentada en elementos radiológicos e histológicos exclusivamente, sino que requiere de un estudio integral e individualizado en cada caso, desde el punto de vista clínico, radiológico, histológico y molecular, con el fin de entender a fondo su comportamiento biológico y a partir de este momento, poder dirigir de una manera más adecuada, un tratamiento específico y personalizado a cada niño. (22)

El glioblastoma es el tumor cerebral primario más común y más agresivo. A pesar del tratamiento máximo, los pacientes sólo tienen una mediana de supervivencia de 15 meses, debido a la resistencia del tumor a los enfoques terapéuticos actuales. En el registro de pacientes de la consulta externa del Hospital de Pediatría del CMN SXXI, se reciben alrededor de 50 pacientes cada año con tumores del sistema nervioso central, de los cuales, el 50% corresponde a astrocitomas.

Hasta el momento, la metilación del ADN metiltransferasa-O6-metilguanina (MGMT) ha sido el único factor predictivo molecular confirmado en el glioblastoma. El tratamiento estándar para los pacientes con diagnóstico reciente de glioblastoma es la remoción macroscópica total, si es posible, seguida de la combinación de la temozolomida alquilante citostático de drogas (TMZ) y RT. (24) La temozolomida se ha convertido en la droga estándar complementando al esquema ifosfamida/carboplatino/etopósido para el tratamiento quimioterápico de los gliomas con alto grado de malignidad. El empleo de este agente citotóxico que presenta la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica, en combinación con la radioterapia, ha tenido gran impacto sobre la progresión y la supervivencia de los pacientes con glioblastomas. (25)

La O6-metilguanina-ADN metiltransferasa (MGMT), es una proteína reparadora que remueve aducciones citotóxicas y mutagénicas de O6-guanina y O4-timina en el ADN. Esta enzima se expresa en todas las células de tejidos normales humanos, sin embargo, 20 a 30% de células neoplásicas son completamente deficientes en su expresión. (26, 29) El sitio más frecuente de alquilación del DNA es en la posición O-6 de guanina. La MGMT revierte rápidamente la alquilación a la posición 6 de la guanina, evitando así la formación de puentes cruzados, y a

través de este mecanismo la MGMT causa resistencia a los fármacos alquilantes dentro de los que se encuentra la temozolomida. En tejidos normales, MGMT actúa como un supresor de mutación y carcinogénesis. Tumores con niveles altos de MGMT son especialmente resistentes a fármacos. La deficiencia de esta enzima puede incrementar la sensibilidad de los tumores cerebrales a los agentes alquilantes, lo cual se ha asociado en adultos a un pronóstico más favorable. (15, 29). Se reporta en la literatura estado de metilación en un 40-57% de los glioblastomas. En el presente estudio se observa una cantidad menor probablemente debido a un número de muestra insuficiente.

La hipermetilación del promotor de MGMT fue encontrado para ser de valor pronóstico favorable en los pacientes con glioblastomas (GBM) o gliomas de bajo grado cuando son tratados con la temozolomida agente de alquilación, con o sin radioterapia adicional. Sin embargo, el papel de la hipermetilación 5'CGI en MGMT silenciamiento génico es aún controversial. Varios estudios que utilizan líneas celulares han informado de una relación entre la expresión del gen MGMT y el promotor de la metilación. Un estudio realizado en líneas celulares de glioma incluso demostró una relación gradual entre la metilación y de expresión. Muchos estudios en los gliomas humanos primarios dan por sentado que el ADN MGMT metilación está directamente relacionada con MGMT dando represión en la transcripción y, por tanto, a menudo se centran en la medición de la metilación de ADN en MGMT como un marcador de la quimiosensibilidad a los agentes alquilantes. Sin embargo, para nuestro conocimiento, sólo uno de los estudios que investigan tanto la metilación del ADN y la expresión de MGMT (o inmunohistoquímica ARNm) en gliomas realidad mostró una presencia mutuamente excluyente de la metilación o expresión en una pequeña serie de ocho gliomas primarios humanos. (26) En el estudio de Donson y cols. (27) se realizó un análisis retrospectivo de diez pacientes pediátricos con glioblastoma, encontrando que el estado de metilación del promotor MGMT puede ser un factor pronóstico en la supervivencia de los pacientes, así como un factor pronóstico del beneficio de la quimioterapia con temozolomida ($P = 0.007$), aunque esto puede deberse a que la metilación de MGMT confiere menor agresividad del

glioblastoma. Bobola et al. (28) encontraron una elevación de la actividad de la enzima MGMT comparado con tejido cerebral normal en un tercio de los niños con glioblastomas que examinaron, sugiriendo que la sobreexpresión de MGMT puede conferir mayor agresividad a estos tumores. Hegi *et al.* (14) evaluaron el estado de metilación de la MGMT como factor predictivo de la supervivencia. La metilación de la MGMT inhibe la reparación del ADN y acentúa el efecto antitumor de los alquilantes. Reportan que la supervivencia media en pacientes con MGMT metilada aumenta hasta 21.7 meses en los pacientes asignados al tratamiento combinado y a 15.3 meses en los tratados sólo con radioterapia. En el estudio fase II del Children's Oncology Group realizado en 104 pacientes con tumores cerebrales, concluyeron que la actividad de la temozolamida puede ser menor en niños que en adultos. (29) Sardi y cols. (30) realizaron un estudio para investigar la relevancia clínica de la expresión de MGMT, encontrando que la expresión de MGMT por si sola es insuficiente para predecir la respuesta a temozolamida a nivel molecular, debido a que existen numerosos mecanismos de reparación de DNA involucrados. En el estudio de Schosser y cols, se reporta que la metilación del DNA, pero no la expresión de la MGMT se asocian con el incremento en el periodo libre de enfermedad en los niños con recaída de los gliomas de alto grado. (31) La mejora en a la respuesta observada en los niños con glioblastomas en comparación con los adultos no puede atribuirse a un aumento en el promotor de MGMT metilado, sin embargo es una evidencia fuerte de que el promotor no metilado predice un peor pronóstico en los niños con glioblastomas. Para este grupo de pacientes se han propuesto tratamientos alternos con diferentes mecanismos de acción o métodos de inhibición de la MGMT, tales como el uso de O⁶ –benzilguanina. (32) Estos estudios moleculares demostraron que las características específicas del tumor, como por ejemplo la presencia de un gen *MGMT* silencioso, permiten ajustar el tratamiento a nivel individual. Los reportes en la edad pediátrica muestran en general, resultados contradictorios. Otras investigaciones mostraron solamente una correlación parcial entre estos dos medidas o ninguna correlación en absoluto. (33, 34, 35, 36)

La superación de la resistencia de las células de glioblastoma contra temozolomida, el agente quimioterapéutico de primera línea de elección para el diagnóstico reciente de glioblastoma, es un reto terapéutico importante en el tratamiento de este tumor cerebral mortal. (37)

En particular, se demostró que la metilación del ADN de MGMT y expresión de la proteína MGMT (inmunohistoquímica) no se puede utilizar indistintamente para predecir la supervivencia para los pacientes con gliomas malignos. Las discordancias observadas entre estas medidas apuntan a la necesidad de clarificar la relación exacta entre la metilación del MGMT y de expresión. (26)

El nivel de MGMT varía ampliamente de acuerdo a cada tipo de tumor, e incluso varía dentro de los tumores del mismo tipo. (15). Un mejor pronóstico se asocia con una menor edad y la resección quirúrgica más extensa seguida de TMZ y RT. (24). Metilación de MGMT se ha encontrado que es más frecuente en secundaria glioblastomas, en las mujeres, y en los supervivientes a largo plazo, mientras que es poco frecuente (5%) en los glioblastomas recurrentes. En este estudio 5/6 pacientes positivos a MGMT presentaron progresión tumoral. (24)

En nuestro estudio llama la atención que 4 de los 6 pacientes fallecidos tenían histología fibrilar, normalmente este es un factor de buen pronóstico, en nuestro caso tal vez sea secundario a la heterogeneidad de la población estudiada y al tamaño de la muestra. A pesar de esto el 66% de los astrocitomas anaplásicos fallecieron.

En nuestro estudio evaluamos la positividad en base a lo descrito previamente por inmunohistoquímica en cuanto a cuantitativo. Se realizó inmunohistoquímica tanto en tejido tumoral como en muestra testigo de cáncer de mama el cual expresa la misma cantidad de positividad, sin embargo la cantidad de pacientes que incluimos en nuestro estudio no es suficiente para confirmar los resultados obtenidos.

En cuanto a nuestro estudio la expresión de MGMT resultó positiva en 6 pacientes (25%) mientras que 18 pacientes resultaron negativos (75%). De los 6 pacientes positivos para MGMT se reportan 2 muertes (33.3%) y 4 permanecen vivos al cierre del estudio (66.6%) sin presentar significancia estadística ($p=0.296$). El OR

para fallecer si la MGMT es positiva es de 1.5 (IC 95% 0.361-6.230). 5 de los 6 pacientes positivos para MGMT presentaron en algún momento de la evolución progresión tumoral. La resección tumoral no tuvo significancia estadística ($p=0.151$) sin embargo si se observó significancia clínica observando sólo 2 muertes (14.2%) en 14 resecciones completas y 4 muertes (40%) en 10 resecciones parciales.

Sin embargo la progresión tumoral si resultó una variable significativa para la sobrevida ($p= 0.017$) que para los que no presentaron progresión con un OR de 7 (IC 95% 0.959-51.094) donde los 5 pacientes que presentaron progresión tumoral fallecieron y sólo un paciente sin progresión tumoral falleció.

Se confirma también que la RT es un factor determinante en la sobrevida al encontrar que los 13 pacientes que recibieron la modalidad de radioterapia como tratamiento sólo se reportaron 2 fallecimientos (15.3%) mientras que en los 11 pacientes que no recibieron esta modalidad se reportaron 4 fallecimientos (36.3%). De los 6 pacientes positivos a MGMT se observan 3 pacientes con astrocitoma de bajo grado: 2 astrocitomas fibrilares y 1 astrocitoma pilocítico sin embargo con características de alto grado por localización supratentorial, manejados sólo con resección parcial de la lesión, dos de ellos con presencia de progresión tumoral y fallecimiento posterior.

Conclusiones

Este estudio demuestra que la metilación MGMT se correlaciona inversamente con la expresión del gen MGMT, pero también señala que la relación entre la metilación y la expresión no es absoluta.

Sin embargo, el mejor ensayo de metilación de MGMT sigue sin resolverse y todavía se necesitan comparaciones de ensayos disponibles. Por otra parte, las comparaciones cuidadosas entre los estudios de metilación y de expresión también se debe realizar en el futuro los ensayos clínicos prospectivos para determinar qué información predice mejor sensibilidad a los agentes alquilantes. Hasta la fecha, un número de métodos han sido descritos para inhibir MGMT, sin embargo, su importancia en el uso clínico para el propósito de superar la resistencia a la temozolomida es todavía limitada o desconocida. Sin embargo, hasta la fecha, las vías de señalización que regulan la MGMT en células de glioblastoma con expresión de MGMT han sido mal delineados. Nuestros hallazgos sugieren que la expresión de MGMT en combinación con temozolomida podría ser una novedosa y prometedora estrategia terapéutica en el tratamiento del glioblastoma. Sin embargo se requieren estudios controlados posteriores con un mayor número de muestras para lograr resultados de mayor trascendencia. La resistencia a la temozolomida es todavía limitada o desconocida. Este estudio constituye así un importante paso adelante en la lucha contra el glioblastoma, añadiendo nuevas armas en nuestro arsenal para combatir esta enfermedad mortal.

BIBLIOGRAFIA

1. López-Aguilar E, Sepúlveda-Vildósola AC, Rioscovian-Soto AP, Diego- Pérez-Ramírez J, Siordia-Reyes G. Tumores cerebrales en pediatría. Estado actual del diagnóstico y tratamiento. *GAMO* 2011; 10: 41-45
2. López Aguilar E, Gascón-Lastiri G, Sepúlveda-Vildósola AC, Barrientos C, Ramírez G, De la Cruz-Yáñez H. Correlación de la expresión de la apoptosis, con la respuesta a tratamiento y sobrevida en niños con astrocitoma. *GAMO* 2011; 10: 32-39
3. López Aguilar E, Sepúlveda-Vildósola AC, Rioscovian-Soto AP, Mendoza-Galván L, García-Vázquez F, Ignacio F, De la Cruz-Yáñez H. Sobreexpresión de p53 como factor pronóstico en niños con astrocitoma. *GAMO* 2011; 10: 19-25
4. Fajardo-Gutiérrez A, Juárez-Ocaña S, González-Miranda G, Palma-Padilla V, Carreón-Cruz R, Ortega-Alvárez MC, Mejía-Arangure JM. 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, 7:68; 2-15
5. Pizzo A. Poplack D. Principles and Practice of Pediatric Oncology. 6^o Edition 2006; 771-792
6. Kleihues P, Soylemezoglu F, Schäuble B, Scheithauer BW, Burger P. Histopathology, classification, and grading of gliomas. *Glia*. 1995;15 (3):211-21
7. López Aguilar E, Arellano-Llamas A, Ignacio F, Sepúlveda-Vildósola AC, García-Vásquez FJ, Rioscovian-Soto AP. CD133 se asocia con el pronóstico en astrocitoma pediátrico. *GAMO* 2011; 10: 13-18
8. Louis D, Ohgaki H, Wiestler O, Cavenee W, Burger P, Jouvet A, Scheithauer B, Kleihues P. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol* 2007; 114:97–109
9. Santivasi W, Xia F. The role and clinical significance of DNA damage response and repair pathways in primary brain tumors. *Cell & Bioscience* 2013, 3:10; 1-6
10. Fukushige S, Horii A. DNA methylation in cancer: A gene silencing mechanism and the clinical potential of its biomarkers. *Tohoku J. Exp. Med*, 2013, 229, 173-185
11. Gömöri E, Pál J, Kovács B, Dóczy T. Concurrent hypermethylation of DNMT1, MGMT and EGFR genes in progression of gliomas. *Diagnostic Pathology*. 2012 7:8, 1-9
12. Bleeker F, Molenaar R, Leenstra S. Recent advances in the molecular understanding of glioblastoma. *J Neurooncol* 2012, 108:11–27
13. Melguizo C, Prados J, González B, Ortiz R, Conchas A, Alvarez P, Madeddu R, Perazzoli G, Oliver J, López R, Rodríguez-Serrano F, Aránega A. MGMT promoter methylation status and MGMT and CD133 immunohistochemical expression as prognostic markers in glioblastoma patients treated with temozolomide plus radiotherapy. *Journal of Translational Medicine*, 2012. 10:250, 1-11
14. Hegi M, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros J, Hainfellner J, Mason W, Mariani L, Bromberg J, Hau P, Mirimanoff R, Cairncross G, Janzer R, Stupp R. *MGMT* Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *NEJM* 2005;352: 997-1003.

15. Esteller M, García-Foncillas J, Andion E, Goodman S, Hidalgo O, Vanaclocha V, Baylin S, Herman J. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *NEJM*. 2000; 343; 1350-1354.
16. Bady P, Sciuscio D, Diserens AC, Bloch J, Van den Bent M, Marosi Ch, Dietrich P, Weller D, Mariani L, Heppner F, McDonald D, Lacombe D, Stupp R, Delorenzi M, Hegi M. MGMT methylation analysis of glioblastoma on the Infinium methylation BeadChip identifies two distinct CpG regions associated with gene silencing and outcome, yielding a prediction model for comparisons across datasets, tumor grades, and CIMP-status. *Acta Neuropathol* (2012) 124:547–560
17. Crinière E, Kaloshi G, Laigle-Donadey F, Lejeune J, Auger N, Benouaich-Amiel A, Everhard S, Mokhtari K, Polivka M, Delattre J, Hoang-Xuan K, Thillet J, Sanson M. MGMT prognostic impact on glioblastoma is dependent on therapeutic modalities. *Journal of Neuro-Oncology*. 2007, 83, 2, 173-179
18. Everhard S, Tost J, Abdalaoui E, Crinière E, Busato F, Marie Y, Gut I, Sanson M, Mokhtari K, Laigle-Donadey F, Hoang-Xuan K, Delattre JY, Thillet J. Identification of regions correlating MGMT promoter methylation and gene expression in glioblastomas. *Neuro-Oncology*. 2009, 11, 348–356
19. Okita Y, Narita Y, Miyakita Y, Ohno M, Fukushima S, Kayama T, Shibui S. Pathological findings and prognostic factors in recurrent glioblastomas. *Brain tumor pathol*. 2012; 29 (4). 192-200
20. Christians A, Hartmann C, Benner A, Meyer J, Von Deimling A, Weller M, Wick W, Weiler M. Prognostic Value of Three Different Methods of MGMT Promoter Methylation Analysis in a Prospective Trial on Newly Diagnosed Glioblastoma. *Plos one* 2012, 7(3): 1-9
21. US Mortality Files, National Center for Health Statistics, Centers for Disease Control and Prevention. *Cancer Statistics Review 1975-2006* National Cancer Institute
22. Harris LC; et al. *Carcinogenesis*, 1996, 17(2):219-24.
23. Konstantinidou AE, Korkolopoulou P, Patsouris E. Apoptotic markers for primary brain tumor prognosis. *J Neurooncol*. 2005;72(2):151-6.
24. Fonneer E, Bleeker, Remco J. Molenaar, Sieger Leenstra, J. Recent advances in the molecular understanding of glioblastoma. *Neurooncol* (2012) 108:11–27
25. Dunn J, Baborie A, Alam F, Joyce K, Moxham M, Sibson R, Crooks D, Husband D, Shenoy A, Brodbelt A, Wong H, Liloglou T, Haylock B, Walker C. Extent of MGMT promoter methylation correlates with outcome in glioblastomas given temozolomide and radiotherapy, *BJO*. 2009; 101: 124 – 131.
26. Sibille Everhard, Jörg Tost, Hafida El Abdalaoui, Emmanuelle Crinière, Florence Busato, Yannick Marie, Ivo G. Gut, Marc Sanson, Karima Mokhtari, Florence Laigle-Donadey, Khê Hoang-Xuan, Jean-Yves Delattre, and Joëlle Thillet. Identification of regions correlating MGMT promoter methylation and gene expression in glioblastomas. *Neuro-Oncology* 11, 348–356, 2009
27. [Donson AM](#), [Addo-Yobo SO](#), [Handler MH](#), [Gore L](#), [Foreman NK](#). MGMT promoter methylation correlates with survival benefit and sensitivity to temozolomide in pediatric glioblastoma. [Pediatr Blood Cancer](#). 2007;48:403-7.
28. Bobola MS, Silber JR, Ellenbogen RL, et al. O⁶-methylguanine- DNA methyltransferase, O⁶-benzylguanine, and resistance to clinical alkylators in pediatric primary brain tumors cell lines. *Clin Cancer Res*. 2005; 11; 2747- 2755.

29. Nicholson HS, Kretschmar CS, Krailo M, *et al*: Phase 2 study of temozolomide in children and adolescents with recurrent central nervous system tumors: a report from the Children's Oncology Group. *Cancer* 2007;110: 1542-1550.
30. Sardi I, Cetica V, Masimino M, Buccoliero A, Giunti L, Genitori L, Arico M. Promoter methylation and expression analysis of MGMT in advanced pediatric brain tumors. *Oncology reports* 2009; 22; 773-779.
31. [Schlosser S](#), [Wagner S](#), [Mühlich J](#), [Hasselblatt M](#), [Gerss J](#), [Wolff JE](#), [Frühwald MC](#). MGMT as a potential stratification marker in relapsed high-grade glioma of children: the HIT-GBM experience. [Pediatr Blood Cancer](#). 2010;54:228-37.
32. Friedman HS, Pluda J, Quinn JA. Phase I trial of carmustine plus O⁶-benzylguanine for patients with recurrent or progressive malignant glioma. *J Clin Oncol* 2000; 18: 3522-3528.
33. Maxwell JA, Johnson SP, Quinn JA, *et al*. Quantitative analysis of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase in malignant glioma. *Mol Cancer Ther*. 2006;5:2531-2539.
34. Jeuken JW, Cornelissen SJ, Vriezen M, *et al*. MS-MLPA: an attractive alternative laboratory assay for robust, reliable, and semiquantitative detection of MGMT promoter hypermethylation in gliomas. *Lab Invest*. 2007;87:1055-1065.
35. Brell M, Tor tosa A, Verger E, *et al*. Prognostic significance of O6-methylguanine-DNA methyltransferase determined by promoter hypermethylation and immunohistochemical expression in anaplastic gliomas. *Clin Cancer Res*. 2005;11:5167-5174.
36. Grasbon-Frodl EM, Kreth FW, Ruitter M, *et al*. Intratumoral homogeneity of MGMT promoter hypermethylation as demonstrated in serial stereotactic specimens from anaplastic astrocytomas and glioblastomas. *Int J Cancer*. 2007;121:2458-2464.
37. Atsushi S, Jun Sunayama, Ken-ichiro Matsuda, Shizuka S, Kaori S, Watanabe E, Tachibana W, Arata Tomiyama, Takamasa Kayama, Chifumi Kitanaka. MEK-ERK Signaling Dictates DNA-Repair Gene MGMT Expression and Temozolomide Resistance of Stem-Like Glioblastoma Cells via the MDM2-p53 Axis. *STEM CELLS* 2011;29:1942-1951.

ANEXOS

ANEXO 1. HOJA DE RECOLECCION DE DATOS

Nombre del paciente			#
Filiación		edad	Sexo
Fecha de Diagnostico	Fecha de última cita	Fecha de recaída	Fecha defunción
Diagnóstico histopatológico		Localización del tumor	
PQ	Estudio radiológico		
Quimioterapia No () Si()	Esquema quimioterapéutico		
Radioterapia No () Si()	Gy		
Expresión de marcadores			
	MGMT		
Expresión			
Porcentaje			