



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud

Diferenciación entre tumor recurrente y radionecrosis por expresión sérica de marcadores inflamatorios en pacientes con gliomas de alto grado

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA

SERGIO MORENO JIMÉNEZ

TUTOR

DR. LUIS CAMILO RÍOS CASTAÑEDA

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL

DRA. LUCINDA AGUIRRE CRUZ

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía

Ciudad Universitaria, Agosto del 2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

Introducción	3
Protocolo de Investigación	4
Artículo 1. Diffusion tensor imaging in radiosurgical callosotomy	50
Artículo 2. Choline-to-N-acetyl aspartate and lipids-lactate-to-creatine ratios together with age assemble a significant Cox's proportional-hazards regression model for prediction of survival in high-grade gliomas	51
Artículo 3. RB mutation and RAS overexpression induce resistance to NK cell-mediated cytotoxicity in glioma cells	53
Artículo 4. Global diffusion tensor imaging derived metrics differentiate glioblastoma multiforme vs normal brains by using discriminant analysis: introduction of a novel whole-brain approach	55
Conclusiones	57

Introducción

El título de la tesis es “Diferenciación entre tumor recurrente y radionecrosis por expresión sérica de marcadores inflamatorios en pacientes con gliomas de alto grado”.

Los artículos seleccionados corresponden a trabajos de investigación y fueron seleccionados para tener un reporte de caso y su análisis a profundidad, un estudio de análisis de sobrevida, otro de análisis discriminante, y otro de investigación básica, con la finalidad de poder permitir una discusión acerca de metodología de la investigación y bioestadística desde diferentes enfoques. Los artículos seleccionados son los siguientes.

1. Diffusion tensor imaging in radiosurgical callosotomy.
2. Choline-to-N-acetyl aspartate and lipids-lactate-to-creatine ratios together with age assemble a significant Cox's proportional-hazards regression model for prediction of survival in high-grade gliomas.
3. RB mutation and RAS overexpression induce resistance to NK cell-mediated cytotoxicity in glioma cells.
4. Global diffusion tensor imaging derived metrics differentiate glioblastoma multiforme vs normal brains by using discriminant analysis: introduction of a novel whole-brain approach.

En seguida tenemos el manuscrito completo incluyendo el Proyecto de investigación original y los artículos seleccionados.

PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

RESUMEN

Entre los tumores cerebrales primarios del sistema nervioso central, los gliomas de alto grado de malignidad son los más frecuentes y con peor pronóstico. Su tratamiento convencional consiste en resección quirúrgica amplia, quimio- y radioterapia adyuvantes. A pesar del tratamiento completo, la recurrencia tumoral es la regla. El diagnóstico diferencial entre recurrencia tumoral y radionecrosis es difícil cuando se trata de un paciente con glioma de alto grado ya tratado, que tiene una lesión en la IRM (Imagen de Resonancia Magnética) que refuerza con el medio de contraste. La evolución de los pacientes con recurrencia tumoral o radionecrosis es diferente. Cuando se trata de recurrencia tumoral la sobrevida es corta a pesar del tratamiento, mientras que cuando se trata de radionecrosis es un poco más prolongada, lográndose la estabilización del paciente a corto plazo con tratamiento. El objetivo de este estudio es determinar la utilidad de las mediciones de diferentes citocinas séricas para tratar de diferenciar el patrón de cambios de niveles de citocinas en cada caso y para establecer la diferenciación de recurrencia tumoral y radionecrosis. Esto basado en que el proceso inflamatorio en las dos entidades parece ser diferente.

I. INTRODUCCIÓN

Los tumores cerebrales figuran entre las primeras causas de muerte en los adultos (Deorah, y col., 2006; Chakrabarti, y col., 2005; Mendoza, Cabalé y Fernández, 2004; Wrensch, y col., 2002) y son los tumores más frecuentes en adolescentes de 15 a 19 años (Cuevas, Villasís y Fajardo, 2003). El 80% de este tipo de tumores son oligodendrogliomas y astrocitomas de grado variable de malignidad. El glioma más frecuente y maligno es el glioblastoma multiforme (GBM) o astrocitoma grado IV (Wrensch, y col., 2002; Ohgaki, y col., 2004; Wrensch, y col., 2005; Ohgaki y Kleihues, 2005; Schwartzbaum, y col., 2006), cuyo pronóstico a corto plazo sigue siendo malo a pesar de los avances tecnológicos utilizados para su diagnóstico y tratamiento (Wara, 1985; Kowalczyk, y col., 1997; Pérez Ortiz, y col., 2001; Muñoz Carmona, y col., 2005). No obstante, algunos factores asociados a sobrevida elevada en los pacientes con GBM son: edad menor a 40 años, índice de Karnofsky mayor a 70% y la combinación terapéutica de radio- y quimioterapia (Hou, y col., 2006).

El aumento de sobrevida proporcionado por la radioterapia es de 100 a 150 % (Sheline, 1977; Walter, y col., 1980; Walter, y col., 1988). Sin embargo, su uso causa déficit neurológico en el 2-5 % de los pacientes (Marks, y col., 1981; Shapiro, 1982; Halperin y Burger, 1985) y en ocasiones puede producir rediferenciación histopatológica, lo cual causa controversia de su uso en pacientes con gliomas de malignidad baja (Imperato, Paleologos y Vick, 1990; Szeifert, y col., 2002).

La meta de los tratamientos con radiación ionizante es dirigir la mayor cantidad de radiación al tumor evitando que la dosis dirigida al tejido cerebral

normal rebase los límites de seguridad. Sin embargo, aún con las dosis utilizadas convencionalmente, la radiación causa caída del cabello (epilación) temporal o permanente en los pacientes. La mejoría de las técnicas de radioterapia ha disminuido la aparición de complicaciones serias, pero sigue habiendo casos de radionecrosis cerebral. Así, se han reportado casos de necrosis masiva (Pennybacker y Russell, 1948). La latencia de radionecrosis puede acortarse si se sube la dosis administrada, y los cambios histológicos iniciales consisten en pequeños focos de hemorragias en los capilares, y aumento de la permeabilidad capilar. Estas lesiones se extienden rápidamente a zonas no irradiadas del cerebro. En etapas tardías, las lesiones post-radiación se caracterizan por la presencia de gliosis pronunciada, degeneración progresiva y esclerosis de los vasos adyacentes. Las neuronas son afectadas solamente de manera focal y secundaria. Las meninges y sus vasos sanguíneos, así como las estructuras superficiales como la corteza se afectan con menor frecuencia (Russell, Wilson y Tansley, 1949). El tiempo de aparición de las lesiones va de meses a años después del tratamiento lo cual puede llevar a un diagnóstico erróneo de recurrencia del tumor original (Crompton y Layton, 1961). Se ha propuesto que las alteraciones vasculares pueden ser un factor importante en la producción de radionecrosis tardía, la cual puede simular una recurrencia del tumor primario (Ghatak y White, 1969; Eyster, y col., 1974).

Los avances en neuro-radiología e histopatología han ayudado a caracterizar la radionecrosis de una manera más precisa, además de que algunas intervenciones podrían ayudar a evitar su progresión (Dooms, y col., 1986; Chiang, McBriede, Withers y col, 1993; Pierre G y Mark G, 2003).

La incidencia de radionecrosis en el sistema nervioso central va del 5 al 24% aproximadamente dependiendo de la serie, siendo mayor en los estudios basados en autopsias, siendo la incidencia de edema inducido por radiación bastante más frecuente (Marks, y col., 1981).

Los diversos mecanismos que pudieran contribuir a la neurotoxicidad inducida por radiación incluyen daño vascular, daño a la sustancia blanca y gris, alteraciones en el sistema de enzimas de la fibrinólisis, y mecanismos inmunológicos (Kumar, y cols., 2000). En la lesión aguda inducida por radiación existe una vasodilatación transitoria con cambios variables en la permeabilidad capilar que, en ocasiones, se manifiesta como edema vasogénico (Husain y García, 1976). Los cambios en la permeabilidad capilar, en respuesta a la radioterapia del sistema nervioso central conllevan una variabilidad dependiente del tamaño de las moléculas que lo atraviesan (Levin, Edwards y Byrd, 1979; Edwards, Levin y Byrd 1979). En las lesiones crónicas inducidas por radiación los hallazgos patológicos son: daño endotelial, ectasia vascular y telangiectasias, lo cual provoca aumento de la permeabilidad capilar y edema vasogénico y citotóxico. Existen cambios vasculares progresivos que incluyen engrosamiento de la pared del vaso por hialinización, con una trombosis resultante, infarto y necrosis (Burger y Boyko, 1991). Se sabe también que los oligodendrocitos de la sustancia blanca son extremadamente sensibles a la radiación y que su destrucción está asociada a desmielinización secundaria (Castel y Caille, 1989; Burger y Boyko, 1991). En relación a las alteraciones metabólicas, se ha descrito disminución en la glucólisis, con disminución en el consumo de glucosa, que se correlaciona con disminución de glucosa y oxígeno en los estudios de PET

(Di Chiro, y col., 1988). Sawaya estudió especímenes de tejido cerebral necrótico obtenido de pacientes radiados encontrando ausencia de activador tisular de plasminógeno y exceso de activador urocinasa del plasminógeno. La primera enzima afecta al fibrinógeno durante la coagulación sanguínea, mientras que la segunda, está activa durante la proteólisis extracelular. Los cambios encontrados en forma concomitante pudieran contribuir al edema citotóxico y al desarrollo de necrosis tisular (Sawaya, 1990).

Las variantes de radionecrosis mejor descritas presentan dos patrones: son en “queso Suizo” y en “burbujas de jabón”. El primero, se observa como alteración difusa de la sustancia blanca y la corteza adyacente que provoca reforzamiento de sus márgenes, entremezclado con focos de necrosis. El segundo, es similar, pero más pequeño (Kumar, y col., 2000).

Se ha evaluado la utilidad de diversos estudios de neuroimagen y medicina nuclear para diferenciar radionecrosis y recidiva tumoral en pacientes con gliomas malignos. Durante los últimos 40 años, el estudio de tomografía por emisión de positrones, PET (del inglés “positron emission tomography”) ha dejado de ser una herramienta utilizada exclusivamente en investigación para convertirse en una modalidad de imagen con valor clínico. En la actualidad hay una amplia gama de equipos de PET que incluyen sistemas de complejidad variable (Fahey, 2003). De igual manera, la radioquímica asociada al PET ha ido madurando durante los últimos 20 años. Los cuatro radiotrazadores más utilizados en PET son: Fluoro-18 (^{18}F), Carbono-11 (^{11}C), Nitrógeno-13 (^{13}N) y Oxígeno-15 (^{15}O). Estos radionúclidos son isótopos de elementos que se encuentran comúnmente en los compuestos biológicos

(carbono, nitrógeno y oxígeno) o sirven como un reemplazo isotérico para el hidrógeno. Los radiotrazadores más utilizados son ^{11}C y ^{18}F , dado que su vida media es más larga que la de sus congéneres. En oncología el radiofármaco más utilizado es el F-18 fluorodesoxiglucosa (FDG), el cual es sintetizado de manera rutinaria utilizando ^{18}F fluoruro en una reacción de desplazamiento fluoro- por- alquil sulfonato $\text{S}_{\text{N}}2$.

La elevada captura de FDG a nivel cerebral de manera normal hace que la interpretación de las imágenes sea difícil en algunos casos. Esto llevó al desarrollo de nuevos radiofármacos cuya captura o localización se basara en el uso una molécula diferente a la glucosa y que tuviera mecanismos diferentes. Esto es particularmente verdadero en aplicaciones oncológicas, en donde los trazadores del PET han sido desarrollados para seguir la síntesis de proteínas o de ácido desoxirribonucleico (DNA).

Se ha desarrollado una gran cantidad de aminoácidos marcados con la intención de medir los índices de síntesis de proteínas utilizando PET (Mason, y Mathis, 2003), tales como [S-metil- ^{11}C]-L-metionina y [carboxi- ^{11}C]-L-metionina, los cuales han mostrado ser útiles para delimitar tejido tumoral (Derlon 1997; Chung 2002).

A pesar de que el número de radiotrazadores para PET está en el rango de los cientos, aún queda mucho trabajo por desarrollar y en México se contaba solamente con FDG-glucosa hasta hace unos pocos años.

Tsuyuguchi y colaboradores evaluaron la utilidad clínica del Met-PET para la diferenciación entre glioma maligno recurrente (GMR) y necrosis post-radiación (NPR) después de radiocirugía estereotáctica. Estudiaron 11 pacientes con gliomas de grados III o IV, los cuales habían sido sometidos a

radioterapia concluyendo que el Met-PET es un estudio sensible y preciso para lograr la diferenciación (Tsuyuguchi, y col., 2004).

Patronas y colaboradores reportaron los resultados preliminares después de evaluar cinco casos de pacientes con diagnóstico inicial de astrocitomas grado II, quienes posteriormente presentaron deterioro neurológico encontrando que el PET con FDG-glucosa fue útil para diferenciar los casos de radionecrosis de los de recurrencia tumoral. Todos los casos fueron confirmados histológicamente mediante biopsia o autopsia (Patronas, y col., 1982).

Valk y colaboradores utilizaron PET con rubidio-82 (^{82}Rb) y fluor-18-fluorodesoxiglucosa (^{18}FDG) para diagnosticar recurrencia de tumor activo y para diferenciar la lesión secundaria a radiación intersticial en gliomas malignos, encontrando que la naturaleza funcional del PET permite hacer la diferenciación que no se logra en los estudios anatómicos de neuroimagen (Valk, y col., 1988).

Ricci y colaboradores concluyeron en su estudio que el PET-FDG tiene una utilidad limitada para la diferenciación entre recurrencia tumoral y radionecrosis, encontrando que se pueden presentar tanto falsos positivos como falsos negativos que contribuyen a valores inaceptablemente bajos de sensibilidad y especificidad (Ricci, y col., 1998).

En otro estudio realizado por Thompson y colaboradores se concluyó que el PET-FDG es insuficiente para diferenciar entre radionecrosis y progresión tumoral (Thompson, Lunsford, y Kondziolka, 1999).

Se han realizado más estudios para valorar la utilidad del PET ya sea con FDG o con Metionina para lograr el diagnóstico diferencial con resultados

variables (Lilja, y col., 1989; Ogawa, y col., 1991; Dethy, y col., 1994; Ogawa, y col., 1995 A; Ogawa, y col., 1995; Sonoda, y col., 1998; DeWitte, y col., 2001; Tsuyuguchi, y col., 2003).

Chao y colaboradores hicieron una gran aportación al demostrar que al hacer un co-registro entre la IRM y el PET-FDG se mejora la sensibilidad, haciéndolo una herramienta útil para diferenciar entre radionecrosis y recurrencia de metástasis cerebrales (Chao, y col., 2001).

En algunas ocasiones no son suficientes las secuencias convencionales de IRM para lograr diferenciar entre dos entidades diferentes. Tal es el caso de la radionecrosis y la recurrencia tumoral, en el cual es necesario hacer uso de técnicas de imagen molecular como la espectroscopia (Bruhn, y col., 1989; Leyten, y col., 1990; Gill, y col., 1990; Sappey-Mariner, y col., 1992; Fulham, y col., 1992; Castillo, Kwock, y Suresh, 1996; Hyun, y col., 1997;). Mediante este estudio es posible saber la composición molecular de la estructura que se está analizando ya que da un patrón muy característico en cada caso. Así, es posible diferenciar lesiones inflamatorias de neoplasias malignas o benignas y de lesiones inducidas por radiación (Glickson, 1989; McBride, y col., 1995; Castillo, Kwock, y Kim, 1998; Andrew, y col., 1998; Meng, y col., 2002; Ping, y col., 2002).

La espectroscopia por IRM ha sido utilizada para intentar predecir la naturaleza de la patología y la evolución clínica en pacientes con tumores cerebrales. Lin y colaboradores reportaron que en el 96% de los casos estudiados se logró establecer una predicción precisa con este método (Lin, Bluml, y Mamelak, 1999).

Wald y colaboradores reportaron la utilidad de la espectroscopia por IRM para detectar cambios metabólicos después del tratamiento de tumores cerebrales. La espectroscopia mostró diferencias significativas entre la presencia de tumor residual o recurrente y la necrosis inducida por radiación. Las regiones con niveles anormalmente elevados de colina (Cho), consistentes con viabilidad tumoral, fueron detectados más allá de las regiones que reforzaban con contraste. Reportaron cambios en los estudios subsecuentes de espectroscopias después del tratamiento reflejando una alteración del metabolismo. Estos cambios incluyeron una reducción significativa de Cho después del tratamiento, indicando la transformación del tumor en tejido necrótico. Asimismo, los pacientes con progresión clínica presentaron incremento de niveles de Cho en sitios que previamente aparecían con niveles normales o de necrosis (Wald, y col., 1997).

En un estudio realizado por Dowling y colaboradores se correlacionaron los niveles de metabolitos de la espectroscopia por resonancia magnética preoperatoria con los hallazgos histopatológicos de la biopsia guiada por imagen. Todas las lesiones estudiadas mostraron un espectro anormal en comparación con el parénquima normal. Cuando el patrón de los metabolitos de la espectroscopia consistió en una elevación anormal de la colina Cho y disminución del N-acetil aspartato (NAA), los hallazgos histológicos de la biopsia invariablemente fueron positivos para tumor. Cuando la Cho y el NAA estaban por debajo del rango normal, los hallazgos histológicos fueron variables, yendo desde radionecrosis, astrogliosis e infiltración por macrófagos hasta tejidos mixtos que contenían grados bajos, intermedios o altos de tumor (Dowling, y col., 2001).

La difusión por IRM es fundamentalmente diferente a las secuencias de T1 y T2 de la IRM. De hecho, los principios físicos que subyacen a la difusión hacen que sea más fácil de entender. Las secuencias de T1 y T2 de IRM se basan en el tiempo que se tardan las moléculas en regresar a su estado original de reposo después de haber recibido una serie de excitaciones. La difusión de la IRM se basa en la habilidad para pintar visualmente la velocidad relativa a la cual las moléculas de agua difunden en el tejido. En el cerebro humano la difusión es mayor en los ventrículos donde hay pocas barreras para la difusión de las moléculas de agua. La difusión de las moléculas en el parénquima cerebral es significativamente más lenta debido a la presencia de varias estructuras como membranas y capas de mielina, que impiden la translación de las moléculas de agua. De esta manera, los ventrículos aparecerán hipointensos en relación al parénquima cerebral (Holodny y Ollenschlager, 2002).

Existen estudios como el de Kumar y colaboradores que enfatizan la dificultad que existe en la diferenciación de estas dos entidades mediante el uso de resonancia magnética. Ellos estudiaron una cohorte de 148 pacientes con diagnóstico de glioma maligno, y que se trataron con radioterapia acelerada y carboplatino concomitante, seguido de quimioterapia con procarbazona, lomustina y vincristina. Les hicieron un seguimiento estrecho con imágenes de resonancia magnética y confirmaron diagnóstico de radionecrosis histológicamente en 36 pacientes. Las imágenes en secuencia de T2 no fueron útiles para diferenciar radionecrosis de recurrencia tumoral. Las características comunes y poco comunes de la radionecrosis las describen como presencia de radionecrosis simulando una recurrencia

tumoral en el sitio de la cavidad quirúrgica del tumor original, distante al tumor original pero ipsilateral, o en el lado contralateral, y de múltiples masas de radionecrosis simulando metástasis múltiples o esclerosis múltiple (Kumar, y col., 2000).

Sugahara y colaboradores estudiaron los índices de volumen sanguíneo cerebral relativo o rCBV (del inglés "relative cerebral blood volume") y los índices de Thallio del estudio de tomografía por emisión de fotón único con ^{201}Tl (^{201}Tl -SPECT) en 20 y 12 pacientes respectivamente, para determinar si las imágenes que reforzaban en la resonancia magnética se trataban de recurrencias o no. Solamente en cinco casos hubo una verificación histológica del resultado final, mientras que en el resto de los casos el diagnóstico final se definió de acuerdo a la evolución por imagen de resonancia magnética, tomándose como recurrencia si había crecimiento de la lesión o como tejido con reforzamiento no neoplásico si había estabilidad o disminución de tamaño. Los resultados demostraron que si los rCBV normalizados eran mayores a 2.6 o menores a 0.6, las lesiones que reforzaban se trataban de recurrencia o tejido no neoplásico respectivamente. Todas las lesiones no neoplásicas con reforzamiento tuvieron un índice de Thallio bajo, mientras que tres de cuatro recurrencias tuvieron un índice alto. La conclusión del estudio es que si una lesión con reforzamiento presenta el rCBV normalizado mayor a 2.6 o menor a 0.6 puede sugerir recurrencia o tejido no neoplásico respectivamente sin que sea necesario realizar un examen con ^{201}Tl -SPECT. Sin embargo, cuando el resultado se encuentra entre estos dos números, el uso de ^{201}Tl -SPECT puede ser útil en la diferenciación (Suguhara, y col., 2000).

Los estudios de IRM con difusión pueden ayudar a estudiar las características propias del tumor y ayudar a diferenciarlo de abscesos cerebrales (Krabbe, y col., 1997; Kim, y col., 1998).

Hein y colaboradores mostraron que el estudio de difusión es útil para diferenciar recurrencia o no recurrencia de un tumor. Ellos midieron los coeficientes aparentes de difusión o ADC (del inglés “apparent diffusion coefficient”) por resonancia magnética (IRM) para caracterizar y diferenciar las características morfológicas del edema, la necrosis y el tejido tumoral en pacientes con gliomas de alto grado ya tratados. Hicieron un estudio retrospectivo de 18 pacientes que presentaban áreas de reforzamiento con el contraste en las IRM. Midieron tanto los valores ADC como los índices ADC (ADC de lesión con reforzamiento a ADC de la sustancia blanca contralateral) y los compararon contra el resultado del diagnóstico final. La recurrencia fue establecida ya sea por examen histopatológico o por el curso clínico de la enfermedad en combinación con los estudios de imagen (siete y 11 pacientes respectivamente). Los pacientes con recurrencia y no recurrencia pudieron diferenciarse utilizando las medias de los valores ADC así como los índices ADC. Los índices ADC en el grupo de recurrencia fueron significativamente menores a los del grupo de no recurrencia (Hein, y col., 2004).

Chan y colaboradores demostraron que los ADC de las lesiones inducidas por radiación fueron significativamente mayores que las del parénquima cerebral normal. Encontraron una asociación entre los ADC bajos en las zonas con reforzamiento de contraste y el deterioro morfológico (Chan, y col., 2003).

A pesar de los avances en los estudios de imagen y medicina nuclear antes mencionados, no se ha logrado diferenciar entre radionecrosis y recurrencia tumoral de una manera fidedigna. La controversia en el alcance real de todos los estudios mencionados aún permanece.

Existen marcadores séricos que apoyan la presencia de procesos inflamatorios activos en el cerebro, secundarios a la presencia de un tumor, tales como las interleucinas proinflamatorias (IL-1, IL-4, y FNT-alfa), así como el óxido nítrico.

El óxido nítrico (NO), cuya estructura química es la de un gas radical simple soluble en agua y lípidos, actúa en el cerebro como un segundo mensajero intraneuronal así como neurotransmisor. El NO cerebral se forma del aminoácido arginina por acción de la sintasa de óxido nítrico tipo I (NOS-1). La NOS-1 está presente en algunas regiones del cerebro, particularmente: el estriado, el hipotálamo, el lóbulo orbitario y el cerebelo. La vía metabólica más conocida como productora de NO, comienza con la activación del receptor para glutamato del N-metil-D aspartato (NMDA). La activación de este receptor, ocasiona el influjo de calcio hacia la neurona y la activación por calcio de la NOS-1, que genera NO a partir de la arginina, la cual a su vez se forma a partir de la citrulina. El NO intraneuronal actúa en la molécula de hierro contenida en la guanilato ciclasa e interviene en la formación de guanosin monofosfato cíclico (GMPc), una potente molécula que actúa como segundo mensajero, ésta activa a proteíncinasas específicas y conduce en última instancia a la desfosforilación de las cadenas ligeras de miosina produciendo relajación muscular, lo cual, se traduce en mayor perfusión

regional (Moncada, 1993; Anggard, 1994; Morikawa, 1994; Gally, 1990; Iadecola 1994). Debido a sus propiedades gaseosas, el NO puede difundir también a las neuronas adyacentes, en las que también resulta en la formación de GMPc. El metabolismo del óxido nítrico, da lugar a nitritos y nitratos, los cuales pueden medirse en plasma, orina, o líquido cefalorraquídeo (Pérez-Neri, 2006).

Eventos tales como el ejercicio, la diarrea y la fiebre incrementan los niveles de dichos metabolitos (Moncada, 1993); así mismo, se elevan en enfermedades inflamatorias; los resultados obtenidos en padecimientos neurodegenerativos son controvertidos (Farrel, 1992; Milstien, 1994; Ikeda, 1995). A diferencia de otros neurotransmisores, el NO no se almacena en vesículas sinápticas, ni se libera necesariamente con la despolarización. Sus receptores son, posiblemente, el hierro y otras moléculas reactivas, y no los receptores protéicos convencionales.

En la actualidad, un método utilizado con frecuencia para evaluar si existe participación del óxido nítrico en las enfermedades del sistema nervioso central es la medición de sus metabolitos (nitritos y nitratos), en líquido cefalorraquídeo, mediante la técnica conocida como cromatografía de fase reversa con detección ultravioleta (Zecca, 1998).

Clasificar las citocinas es difícil, pero, se pueden agrupar en 4 grupos funcionales de acuerdo al sitio o fase específica de la respuesta inmune en la que actúen, así: 1. Citocinas pro-inflamatorias, actúan en la respuesta inmune innata, inespecífica o inflamación. 2. Citocinas que favorecen el desarrollo de inmunidad celular y/o citotóxica. 3. Citocinas que favorecen la

producción de las diversas clases de inmunoglobulinas o Inmunidad Humoral y 4. Citocinas con funciones extra-inmunológicas y/o homeostáticas.

1. Citocinas en Inflamación: Las principales citocinas que actúan en la respuesta inespecífica o inflamación son: Interleucina 1, Factor de Necrosis Tumoral Alfa, Interleucina 8, Interleucina 12, Interleucina 16 e Interferones^{10,11, 12}, todas ellas son pro-inflamatorias. IL-6 e IL-12, además, actúan en la inmunidad específica, IL-6 es un factor autocrino de linfocitos B mientras que IL-12 estimula la inmunidad celular citotóxica.

2. Dos son las principales citocinas de Inmunidad Celular o Th1: Interferón gamma o tipo 2, llamado también interferón Inmune porque solo es producido por células inmunológicas activadas; la otra citosina es Interleucina 2 o Factor de Crecimiento de Células T (IL-2 o TCGF). IFN-alfa es el principal activador de macrófagos y células citotóxicas T y NK. Interesantemente IFN alfa tiene acción en la Inmunidad Humoral, induciendo la producción de IgG. IL-2 descubierta en 1977 por Robert Gallo (co-descubridor del VIH) es el factor autocrino de crecimiento de las células T, esencial para mantener viables los cultivos de linfocitos T, también genera células citotóxicas especialmente NK y macrófagos antitumorales) (Barksby HE, 2007).

3. Citocinas de Inmunidad Humoral: La Inmunidad humoral se caracteriza por la secreción de anticuerpos por los linfocitos B o células plasmáticas, las cuales son moduladas por las siguientes citocinas: Interleucina 4 o factor estimulante de células B (IL-4 o BCSF), Interleucina 5 (IL-5), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 10 (IL-10) e interleucina 13 (IL-13). Estas linfocinas son secretadas por linfocitos del tipo Th2, linfocitos B, mastocitos, eosinófilos y algunas por macrófagos (IL-6, IL-13)

4. Las que tienen poco efecto por si solas pero que inhiben o hacen sinergia funcional de otras citocinas (*stem cell factor* (SCF), IL-6, IL-1) (Dinarello CA, 2005)

En este trabajo se puso énfasis en IL-1, IL-4 y FNT-alfa, ya que estos marcadores séricos apoyan la presencia de procesos inflamatorios activos en el cerebro, secundarios a la presencia de un tumor.

La IL-1 es un mediador clave en la respuesta inflamatoria ocasionando fiebre, neutrofilia y producción de proteínas de fase aguda. Codificada en el cromosoma 2, históricamente fue una de las primeras citocinas descubiertas.

La IL-1 es liberada por los macrófagos, monocitos, y células dendríticas en respuesta al factor de necrosis tumoral alfa (TNF alfa). Se conocen tres formas:

La IL-1 α es mayormente intracelular y termina adherida a la membrana celular con efectos paracrinós en el entorno de la célula secretora (Chakrabarti I, 2005).

La IL-1 β es secretada a la circulación e interacciona con dos tipos de receptores: Tipo I: se encuentran sobre la mayoría de las células del cuerpo y parece ser el mediador de las respuestas clásicas de la IL-1; Tipo II: se encuentran sobre linfocitos B, neutrófilos, monocitos y células de la médula ósea (Mendoza A, 2004).

La IL-1RA Es inhibitoria sobre las otras dos formas actuando como antagonista impidiendo la unión de IL-1 α y β a sus respectivos receptores.

La interleucina-1 tiene acciones estimuladoras, así como inhibitorias, sobre diversos tipos celulares e incluso promueve la apoptosis de otras. Entre sus funciones principales están:

Efectos pro-inflamatorios producto de la liberación de histamina por mastocitos, causando vasodilatación y los signos de inflamación localizada.

Tiene actividad quimotáctica sobre los granulocitos.

Es un pirógeno endógeno causando fiebre por liberación de prostaglandinas.

Junto con la IL-6 causa elevación de las proteínas hepáticas de fase aguda (fibrinógeno y proteína C reactiva).

Actúa sobre el sistema nervioso central produciendo sueño y anorexia durante procesos infecciosos por el efecto del óxido nítrico. Ese mismo efecto inhibe la contracción de la musculatura lisa de las arterias y del músculo cardíaco.

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) es una hormona glicopeptídica formada por 185 aminoácidos, que procede de un propéptido formado por 212 aminoácidos. Algunas células sintetizan isoformas más cortas de la molécula. Genéticamente el TNF está relacionado con el cromosoma 7p21.

El TNF α está relacionado con el endotelio y otros tejidos en el transcurso de distintas agresiones celulares como infecciones. Su estimulación está relacionada con otros mediadores celulares como la interleucina 1 y endotoxinas bacterianas.

El TNF ejerce distintas funciones en diferentes órganos, como la activación de la producción de otros mediadores como las interleucinas 1 a la 6.

En el hipotálamo: Estimula el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal estimulando la liberación de hormona liberadora de corticotropina.

En el hígado, estimula de respuesta aguda de la inflamación, activando la síntesis de proteína C reactiva y otros mediadores celulares.

En otros órganos: Aumenta la resistencia a la insulina.

La liberación de TNF- α produce activación local del endotelio vascular, liberación de óxido nítrico con vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular, que conduce al reclutamiento de las células inflamatorias, inmunoglobulinas y complemento, provocando la activación de los linfocitos T y B. También aumenta la activación y adhesión plaquetaria y, probablemente, la oclusión vascular sea la causa de la necrosis tumoral, de donde proviene su nombre. Las funciones del TNF se deben a su unión a 2 receptores celulares diferentes que se localizan en diferentes células como neutrófilos.

En este trabajo evaluaremos la utilidad de la determinación de marcadores séricos para la diferenciación entre radionecrosis y recurrencia tumoral.

II. ENUNCIADO DE INVESTIGACIÓN

- a) Las citocinas inflamatorias son diferentes en los sujetos sanos en comparación con los pacientes con gliomas de alto grado.
- b) Las citocinas inflamatorias son diferentes en los pacientes con recurrencia tumoral en comparación con los pacientes con radionecrosis.

III. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, la diferenciación entre radionecrosis y tumor recurrente en los pacientes con gliomas de alto grado tratados con radioterapia fraccionada es difícil a pesar de los avances en neuroradiología y medicina nuclear.

Esta dificultad en la diferenciación se debe a que ambas lesiones comparten varias similitudes tales como la proximidad al sitio del tumor original, áreas en secuencia T2 de la resonancia magnética que pudieran

consistir en varios grados de edema vasogénico, gliosis y neoplasia, reforzamiento subsecuente a la administración de gadolínico y diferentes grados de efecto de masa.

Esta diferenciación es importante ya que en caso de diagnosticarse radionecrosis el tratamiento puede variar e ir desde observación, tratamiento con corticoesteroides a dosis elevadas o tratamiento antiedema, hasta la resección quirúrgica del área necrótica en los casos extremos. Por otro lado, en caso de diagnosticarse recidiva tumoral, esto nos obliga a ofrecer un tratamiento más radical como pudiera ser una cirugía resectiva nuevamente, en caso de estar accesible y en área no elocuente, o una reirradiación con terapia conformal fraccionada o con radiocirugía.

Este estudio es innovador ya que no se han reportado estudios que comparen los niveles de citocinas en pacientes con gliomas de alto grado y radionecrosis.

No hay estudios en relación a la medición de marcadores bioquímicos con la intención de diferenciar entre radionecrosis y recurrencia tumoral

III. OBJETIVOS

General:

- Determinar la utilidad de los niveles séricos de citocinas proinflamatorias para diferenciar entre radionecrosis y recurrencia tumoral.

Específicos:

- Determinar los niveles séricos de las citocinas en sujetos sanos

- Determinar los niveles séricos de las citocinas en pacientes con gliomas de alto grado
- Comparar los niveles séricos de citocinas en una cohorte de pacientes con glioma de alto grado seguidos en el tiempo y que desarrollan recurrencia tumoral o radionecrosis

IV. HIPÓTESIS

Hipótesis nula: La determinación de los niveles séricos de TNF-alfa e IL-1 beta, IL-6, IL-8, IL-10 e IL 12 es igual en pacientes con recurrencia tumoral y pacientes con radionecrosis.

Hipótesis alterna: La determinación de los niveles séricos de TNF-alfa e IL-1 beta, IL-6, IL-8, IL-10 e IL 12 es diferente en pacientes con recurrencia tumoral y pacientes con radionecrosis.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

A. DISEÑO

Estudio diagnóstico.

Primera parte: Diseño Transversal Analítico. Comparación de sujetos sanos con pacientes con gliomas de alto grado.

Segunda Parte: Diseño de mediciones repetidas (seguimiento de pacientes hasta desarrollo de radionecrosis o recurrencia tumoral).

B. POBLACIÓN

Pacientes del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.

Criterios de Selección

1. Criterios de Inclusión

1. Con diagnóstico histopatológicamente confirmado de glioblastoma multiforme o astrocitoma anaplásico.
 2. Que hayan recibido radioterapia como tratamiento adyuvante.
 3. Que acepten participar en el estudio mediante la firma del consentimiento informado (Ver Anexo 1).
2. Criterios de Exclusión
1. Que no acepten participar en el estudio.
3. Criterios de Eliminación
1. Que presenten hemólisis de la muestra de suero.
 2. Que presentan alguna enfermedad infecciosa al momento de la toma de la muestra de sangre.

C. TAMAÑO DE LA MUESTRA

Se incluirán 10 pacientes como estudio piloto.

D. VARIABLES

Variable Dependiente:

Niveles séricos de TNF-alfa, IL-1 beta, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12

Variables independientes:

Tipo de Paciente (recurrencia vs radionecrosis)

Otras variables:

Sexo

Edad

Índice de Masa Corporal

Ver **Tabla 1.**

E. MÉTODOS

Primera parte:

Se medirán las citocinas séricas en 10 sujetos sanos y en 10 pacientes con gliomas de alto grado, y se compararán los resultados.

Segunda parte:

Al incluir a cada paciente, se tomará una muestra de sangre periférica para la determinación de las citocinas mencionadas antes de operarse y antes de recibir cualquier tratamiento. De manera paralela se medirán las mismas citocinas en sujetos sanos como controles como fue sugerido por el comité evaluador.

Una vez tratado el paciente con radiación ionizante, después de haber sido diagnosticado y operado, se tomará muestra de sangre para la medición de los marcadores bioquímicos que se tomarán en cuenta como mediciones basales. Posteriormente se tomarán muestras nuevamente a los 3, 6, y 9 meses. Finalmente, cuando en alguno de los estudios de resonancia de control, que se toman de rutina cada tres meses, se presente una zona de reforzamiento que obligue a diferenciar entre recurrencia tumoral y radionecrosis, se realizarán los estudios que en seguida se mencionan, y se seguirá en el tiempo de manera longitudinal para determinar la evolución la cual se utilizará como estándar, utilizaremos como referencia la sobrevida del paciente. Se dividirán en pacientes con sobrevida corta y sobrevida larga tomando como punto de corte la mediana de sobrevida. Los primeros se tomarán en cuenta como recurrencia tumoral, mientras que los segundos como radionecrosis.

Determinación de los marcadores séricos inflamatorios. Ver **Anexo 1**.

F. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis descriptivo utilizamos media y desviación estándar para edad, IMC y niveles de citocinas séricas, así como mínimo y máximo.

Utilizamos Prueba Exacta de Fisher para comparación de sexo entre sujetos sanos y pacientes.

Utilizamos la Prueba de U de Mann-Whitney para comparación de IMC en ambos grupos, así como para la comparación de citocinas.

Usamos la Prueba de rangos con signo de Wilcoxon para comparación entre niveles de citocinas basales y citocinas a los 3 meses, y basales y 6 meses.

G. RESULTADOS PRELIMINARES

Primera Parte

Se estudiaron siete sujetos sanos y seis pacientes con glioblastoma.

Descripción de los pacientes sanos

De los siete pacientes sanos, fueron 5 (71.4%) mujeres y 2 (28.6%) hombres.

La media de edad fue de 39.4 años (mínimo de 28 y máximo de 62, DE 12.8).

El IMC tuvo una media de 25.6 (mínimo 20.05 y máximo de 36.26, DE 5.2).

En la siguiente Tabla se muestran los resultados de las diferentes citocinas medias. Ver **Tabla 2**.

Descripción de los pacientes con gliomas de alto grado

De los seis pacientes con tumor, fueron 2 (33.3%) mujeres y 4 (66.7%)

hombres. La media de edad fue de 44.2 años (mínimo de 26 y máximo de 65, DE 14.0). El IMC tuvo una media de 28.0 (mínimo 22.65 y máximo de

37.11, DE 6.2). En la siguiente Tabla se muestran los resultados de las diferentes citocinas medias. Ver **Tabla 3**.

Comparación de sujetos sanos con pacientes con glioma de alto grado

En el grupo de sujetos sanos hubieron 5 mujeres y dos hombres, mientras que en el de pacientes con glioma de alto grado fueron 2 mujeres y 4 hombres (Prueba Exacta de Fisher, $p = 0.286$).

La media de edad para los sujetos sanos fue de 39.4 años, mientras que para los pacientes fue de 44.2 años (Prueba U de Mann-Whitney, $p = 0.534$).

La media del IMC en los sujetos sanos fue de 25.6 y para los pacientes de 28.0 (Prueba U de Mann-Whitney, $p = 0.534$).

En la **Tabla 4** se muestran las comparaciones de las citocinas entre ambos grupos.

No encontramos diferencias significativas entre ambos grupos.

Segunda parte

Se compararon los niveles séricos de citocinas de los pacientes con glioma de alto grado en diferentes tiempos a los 3 y 6 meses. Ver **Tablas 5 y 6**. En la **Tabla 7** podemos ver las comparaciones de citocinas entre la basal y los 3 meses, en tres pacientes, utilizando la Prueba de rangos con signo de Wilcoxon, mientras que en la **Tabla 8** podemos ver la comparación entre niveles basales de citocinas y niveles a los 6 meses.

H. CONCLUSIONES

Se trata de un estudio en el cual encontramos una tendencia a encontrar niveles más elevados de IL-10 en pacientes con gliomas de alto grado en comparación con los sujetos sanos.

La principal limitante del estudio es la muestra tan pequeña con la que contamos.

H. ANEXOS

Anexo 1. Determinación de Marcadores Séricos de Inflamación

Factor de necrosis tumoral alfa IL-1 beta, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12: mediante kits específicos. El ELISA (del inglés "enzyme linked immunosorbent assay") se llevará a cabo mediante el uso de anticuerpos monoclonales que se revelan con anticuerpos secundarios o acoplados a una enzima que a su vez se harán reaccionar con un sustrato para evaluar el nivel de interleucinas mediante lectura de DO en el espectrofotómetro, el método se realizará de acuerdo a las instrucciones del fabricante de los kits. que utiliza como anticuerpo de captura un monoclonal específico para TNF alfa humano (61E71) y como segundo anticuerpo, un policlonal de conejo anti-TNF-alfa humano purificado por inmunoafinidad (Hy cult biotechnology b.v., Uden, Holanda). Placas de 96 pozos (Costar, USA) se recubren con el anticuerpo 61E71 (82.5 microg/ml) diluido (1:1000) en buffer fosfato (PBS), por incubación durante 18 h a 4°C en cámara húmeda. Luego se decanta el contenido de las placas y se adicionaron 125 microlitros/pozo de PBS con albúmina de suero bovino (ASB) al 1% y se incuba por 90 min a temperatura ambiente. Al término de esta incubación, se elimina el contenido de las placas y se adicionan las muestras a evaluar, así como la curva patrón de TNF-alfa humano (10 ng a 25 pg/ml), obtenida por dilución seriada 1:2 en PBS con BSA al 0.1%. Las placas se incuban por 1 hora a temperatura ambiente, se decanta su contenido y se adiciona el anticuerpo policlonal de conejo anti-TNF diluido (1:1000) en PBS con ASH al 0.1%. Luego se deshecha el contenido de los pozos y se adicionan 100 microl de anticuerpo de carnero antiinmunoglobulina de conejo conjugado a peroxidasa (anticonejo

peroxidasa), diluido 1:5000 en PBS con ASB al 0.1%. La placa se incubó por una hora a temperatura ambiente, se decanta su contenido y se lava 5 veces con Tween 20 al 1% en agua destilada y se mantuvo en reposo durante 1 minuto entre cada paso de lavado. La actividad de peroxidasa se determinó por adición de la solución sustrato [dihidrocloruro de 3,3', 3,5' – tetrametilbencidina (Sigma St. Louis, MO)] al 0.01%, peróxido de hidrógeno al 0.025, en solución tampón citrato-fosfato 0.05 M pH 5,5. Transcurridos 15 minutos a temperatura ambiente, deteniendo la reacción por adición de 100 microlitros/pozo de ácido sulfúrico 1 M. La absorbancia se determinó por espectrofotometría a 450 nm en un lector de placas (sensident Scan, Merck, Alemania). El mínimo nivel de detección utilizado fue de 25 pg/ml. Los valores inferiores a esta concentración se consideraron indetectables.

Anexo 2. Carta de Consentimiento Informado

Título del Estudio de Investigación:

Diferenciación entre tumor recurrente y radionecrosis por expresión seria de marcadores inflamatorios en pacientes con gliomas de alto grado

Investigador Principal: Dr. Sergio Moreno Jiménez (Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía MVS, Unidad de Radioneurocirugía).

Propósito y Bases del Estudio: Este es un estudio a cerca de la diferenciación entre actividad tumoral y cambios por radiación en pacientes con gliomas de alto grado previamente radiados. El propósito de este estudio es aprender cuál de los marcadores en sangre es el más útil para lograr esta diferenciación.

Procedimiento: Si yo acepto participar, las siguientes cosas sucederán:

1. Yo contestaré algunas preguntas sobre mi historial médico. Esto durará aproximadamente 15 minutos.
2. Me realizarán una imagen de resonancia magnética nuclear con espectroscopía y con difusión y perfusión. Dura aproximadamente una hora y requiere de que se canalice una vena en la mano, antebrazo o pie según sea el caso en cada paciente. En caso de padecer de claustrofobia (miedo y angustia por estar en un lugar pequeño y cerrado) será necesario planear el estudio con anestesia. Este estudio se hace rutinariamente sin ser parte del protocolo.
3. Me sacaran sangre del brazo (10 ml) con una jeringa y aguja (estériles) para la determinación de los marcadores séricos. La punción generalmente causa cierto dolor que dura menos de un minuto;

ocasionalmente puede haber infección del sitio de la punción aunque esta complicación es muy poco probable. Existe la posibilidad de que aparezca un moretón en el sitio de punción. La sangre extraída se utilizará en el laboratorio para la determinación de cada uno de los marcadores.

4. Una vez confirmado el diagnóstico ya sea de actividad tumoral o de cambios por radiación ("radionecrosis") se me hará saber y se me propondrá un tratamiento específico de acuerdo al resultado de los estudios de radiología, medicina nuclear y de sangre.

Beneficios: El principal beneficio de participar en este estudio es la aportación importante de poder determinar cuál de los estudios por separado o combinados es el mejor para lograr la diferenciación entre recurrencia tumoral (actividad tumoral) y radionecrosis, de esta manera eventualmente se podrán hacer estudios dirigidos sin tener que hacer el protocolo completo de estudios. El beneficio será para otros pacientes en otro momento.

Riesgos: En caso de no participar en el protocolo, los estudios de imagen se realizarán de todas maneras. Lo único diferente es la toma de muestra de sangre de 10 ml para la medición de los marcadores séricos. Los riesgos de esta maniobra son básicamente los mencionados anteriormente en relación al dolor de la punción y a la formación de un moretón, aunque este último es raro.

Los estudios de marcadores séricos no implicarán costo alguno al paciente ni a sus familiares ya que será absorbido por el Instituto.

Confidencialidad: Los resultados de los estudios que se me hagan serán anexados en el expediente. Todos los datos serán manejados

confidencialmente y serán usados con la finalidad de tratarme adecuadamente además de la investigación. Mi identidad será confidencial hasta donde lo permite la ley.

Preguntas: El Dr. _____ me ha explicado la información contenida en esta carta y se ofreció a contestar cualquier pregunta que surja durante el estudio. En caso de tener más preguntas podré contactarlo en el teléfono 56063822 Extensión 4073 ò 4072 o directamente en la unidad de radioneurocirugía del INNN.

Derecho a rechazar la participación en el estudio o abandonarlo: Mi participación en este estudio es totalmente voluntaria. Soy libre de rechazar tomar parte en el estudio o podré abandonarlo en cualquier momento que así lo decida, sin que esta decisión interfiera o afecte mi tratamiento en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía MVS en el futuro.

Consentimiento: Yo **acepto** participar en este estudio. Se me entregó una copia de esta carta y me dieron tiempo para leerla.

Nombre y Firma _____

I. REFERENCIAS

1. Deorah S, Lynch CF, Sibenaller ZA y Ryken TC. Trenches in brain cancer incidence and survival in the United States: Surveillance, Epidemiology, and End Results Program, 1973 to 2001. *Neurosurg Focus* 20(4):E1, 2006.
2. Chakrabarti I, Cockburn M, Cozen W, Wang YP y Preston-Martin S. A Population-based description of glioblastoma multiforme in Los Angeles County, 1974-1999. *Cancer* 2005; 14(12):2798-2806.
3. Mendoza A, Cabaalé M y Fernández ME. Comportamiento Anatomopatológico de los Tumores Cerebrales en el Hospital General "Lucía Iñiguez". Año 2003. *Correo Científico Médico de Holguín* 2004; 8(3):1-6.
4. Wrensch M, Minn Y, Chef T, Bondy M y Berger MS. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neuro-oncol* 2002; 4(4):278-299.
5. Cuevas-Urióstegui ML, Villasís-Keever MA y Fajardo-Gutiérrez A. Epidemiología del cáncer en adolescentes. *Salud Publica Mex* 2003; 45(suppl 1):S115-S123.
6. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, Burkhard C, Schuler D, Probst-Hensch NM, Maiorka PC, Baeza N, Pisan P, Yonekawa Y, Yasargil MG, Lutolf UM y Kleihues P. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* 2004; 64(19):6892-9.

7. Wrensch M, Fisher JL, Schwartzbaum JA, Bondy M, Berger M y Aldape KD. The molecular epidemiology of gliomas in adults. *Neurosurg Focus* 2005; 19(5):E5.
8. Ohgaki H y Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol (Berl)* 2005; 109(1):93-108.
9. Schwartzbaum JA, Fisher JL, Aldape KD y Wrensch M. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat Clin Pract Neurol* 2006; 2(9): 494-503.
10. Wara WM. Radiation therapy for brain tumors. *Cancer* 1985; 55:2291-8.
11. Kowalczyk A, McDonald RL, Amidel CH, Dohrmann III G, Ericsson RK, Hekmatpanah J, y cols. Quantitative imaging study of extent of surgical resection and prognosis of malignant astrocytomas. *Neurosurgery* 1997; 41:1028-38.
12. Pérez Ortiz L, Rodríguez Ramos E, Figueredo Rodríguez R, Barroso García E. Astrocitoma anaplásico y glioblastoma multiforme. Factores que influyen en la supervivencia. *Rev Cubana Cir* 2001; 40(2):87-91.
13. Muñoz Carmona DM, Faga Cantamessa C, Márquez García-Salazar M, Gómez Millán J y Bayo E. Nuevas perspectivas en el tratamiento paliativo de glioblastoma multiforme y astrocitoma anaplásico recidivado con implantes de carmustina. *Oncología* 2005; 28(5): 249-257.
14. Hou LC, Veeravagu A, Hsu AR y Tse VCK. Recurrent glioblastoma multiforme: a review of natural history and management options. *Neurosurg Focus* 2006; 20(4):E3.s

15. Sheline GE. Radiation therapy of brain tumors. *Cancer* 1977; 39:873-881.
16. Walter MD, Green SB, Byar DP, y cols. Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery. *N Engl J Med* 1980; 303:1323-1329.
17. Walter MD, Alexander E, Hunt WE, y cols. Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastia gliomas 1988; 6:201-206.
18. Marks JE, Baglan RJ, Para Sad SC, Blank WF. Cerebral radionecrosis: incidente and risk in relation to dose, time, fractionation and volume. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1981; 7:243-252.
19. Shapiro WR. Treatment of neuroectodermal brain tumors. *Ann Neurol* 1982; 12:231-237.
20. Halperin EC, Burger PC. Convencional external beam radiotherapy for central nervous system malignancies. *Neurol Clin* 1985; 3:867-882.
21. Imperato JP, Paleologos NA y Vick NA. Effect of Treatment on Long-Term Survivors with Malignant Astrocytomas. *Ann Neurol* 1990; 28:818-822.
22. Szeifert GT, Masanger N, Brotchi J, Levivier M. Morphological redifferentation in a malignant astrocytic tumor after gamma knife radiosurgery. *J Neurosurg* 2002; 97:627-630.
23. Pennybacker J y Russell DS. Necrosis of the brain due to radiation therapy. *J Neurol Neurosurg Psychiat* 1948; 11:183-198.
24. Russell DS, Wilson CW, y Tansley K. Experimental Radionecrosis of the brain in rabbits. *J Neurol Neurosurg Psychiat* 1949; 12:187-195.

25. Crompton MR y Layton DD. Delayed Radio Necrosis of the Brain Following Therapeutic X-radiation of the Pituitary. *Brain* 1961; 84:85-101.
26. Ghatak NR y White BE. Delayed Radiation Necrosis of the Hypothalamus: Report of a Case Simulating Recurrent Craniopharyngioma. *Arch Neurol* 1969; 21:425-430.
27. Eyster EF, Nielsen SL, Sheline GE y Wilson CB. Cerebral radiation necrosis simulating a brain tumor. *J Neurosurg* 1974; 39:267-271.
28. Doms GC, Hecht S, Brant-Zawadzki M, Berthiaume Y, Norman D, Newton TH. Brain radiations lesions: MR imaging. *Radiology* 1986; 58:149-155.
29. Chiang CS, McBride WH, Withers HR. Radiation-induced astrocytic and microglial responses in mouse brain. *Radiother Oncol* 1993; 29:60-68.
30. Pierre G y Mark G. Brain Radiation Necrosis. *Neurologist* 2003; 9(4): 180-188.
31. Marks JE, Baglan RJ, Prasad SC y Blank WF. Cerebral radionecrosis: incidence and risk in relation to dose, time, fractionation and volume. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1981; 7:243-252.
32. Kumar AJ, Leeds NE, Fuller GN, Van Tassel P, Maor MH, Sawaya RE y Levin VA. Malignant Gliomas: MR Imaging Spectrum of Radiation Therapy- and Chemotherapy-induced Necrosis of the Brain after Treatment. *Radiology* 2000; 217:377-384.
33. Husain MM, Garcia JH. Cerebral "radiation necrosis": vascular and glial features. *Acta Neuropathologica* 1976; 36:381-385.

34. Levin VA, Edwards MS y Byrd A. Quantitative observations of the acute effects of X-irradiation on brain capillary permeability: part I. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1979; 5:1627-1631.
35. Edwards MS, Levin VA y Byrd A. Quantitative observations of the subacute effects of x-irradiation on brain capillary permeability: part II. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1979; 5:1633-1635.
36. Burger PC y Boyko OB. The pathology of central nervous system radiation injury. En Gutin PH, Leible SA, Sheline GE, eds. *Radiation injury to the nervous system*. New York: Raven, 1991; 191-208.
37. Castel JC y Caille JM. Imaging of irradiated brain tumours: value of magnetic resonance imaging. *J Neuroradiol* 1989; 16:81-132.
38. Di Chiro G, Oldfield E, Wright DC y cols. Cerebral necrosis after radiotherapy and/or intraarterial chemotherapy for brain tumors: PET and neuropathologic studies. *AJR Am J Roentgenol* 1988; 150:189-197.
39. Sawaya R. The fibrinolytic enzymes in the biology of brain tumors. En Sawaya MD, ed. *Fibrinolysis and the central nervous system*. Philadelphia, Pa: Hanley & Belfus, 1990; 106-126.
40. Fahey FH. Instrumentation in positron emission tomography. *Neuroimag Clin N Am* 2003; 13:659-669.
41. Mason NS, Mathis CA. Positron emission tomography radiochemistry. *Neuroimag Clin N Am* 2003; 13:671-687.
42. Derlon JM, Petit-Taboue MC, Chapon F, Beaudouin V, Noel MH, Creveuil C, et al. The in vivo metabolic pattern of low-grade brain gliomas: a positron emission tomographic study using ^{18}F -

- fluorodeoxyglucose and ^{11}C -L-methionine. *Neurosurgery* 1997; 40:276-88.
43. Chung JK, Kim YK, Kim SK, Lee YJ, Paek S, Yeo JS, et al. Usefulness of ^{11}C -methionine PET in the evaluation of brain lesions that are hypo- or isometabolic on ^{18}F -FDG PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2002; 29:176-182.
44. Tsuyuguchi N, Takami T, Sunada I, Iwai Y, Yamanaka K, Tanaka K, Nishikawa M, Ohata K, Torii K, Morino M, Nishio A, Hara M. Methionine positron emission tomography for differentiation of recurrent brain tumor and radiation necrosis stereotactic radiosurgery. In *Malignant Glioma. Annals of Nuclear Medicine* 2004; 18:291-29.
45. Patronas NJ, Di Chiro G, Brooks RA, DeLaPaz RL, Kornblith PL, SNT BH, Rizzoli HV, Kessler RM, Manning RG, Channing M, Wolf AP, O'Connor CM. Work in Progress: [^{18}F] Fluorodeoxyglucose and Positron Emission Tomography in the Evaluation of radiation Necrosis of the Brain. *Radiology* 1982; 144:885-889.
46. Valk PE, Budinger TF, Levin VA, Silver P, Gutin PH, Doyle WK. PET of malignant cerebral tumors after interstitial brachytherapy. *J Neurosurg* 1988; 69:830-838.
47. Ricci PE, Karis JP, Heiserman JE, Fram EK, Bice AN, Drayer BP. Differentiating Recurrent Tumor from Radiation Necrosis: Time for Re-evaluation of Positron Emission Tomography. *AJNR Am J Neuroradiol* 1998; 19:407-413.

48. Thompson TP, Lunsford LD, Kondziolka D. Distinguishing Recurrent Tumor and Radiation Necrosis with Positron Emission Tomography versus Stereotactic Biopsy. *Stereotact Funct Neurosurg* 1999; 73:9-14.
49. Lilja A, Lundqvist H, Olson Y, Spannare B, Gullberg P, Langstrom B. Positron emission tomography and computed tomography in differential diagnosis between recurrent or residual glioma and treatment-induced brain lesions. *Acts Radiol* 1989; 30:121-128.
50. Ogawa T, Kanno I, Shishido F, Inugami A, Higano S, Fujita H, et al. Clinical value of PET with ^{18}F -fluorodeoxyglucose and L-methyl- ^{11}C -methionine for diagnosis of recurrent brain tumor and radiation injury. *Acta Radiol* 1991; 32:197-202.
51. Dethy S, Goldman S, Blečić S, Luxen A, Levivier M, Hildebrand J. Carbon-11-methionine and fluorine-18-FDG PET study in brain hematoma. *J Nucl Med* 1994; 35:1162-1166.
52. Ogawa T, Hatazawa J, Inugami A, Murakami M, Fujita H, Shimosegawa E, et al. Carbon-11-methionine PET evaluation of intracerebral hematoma: distinguishing neoplastic from non-neoplastic hematoma. *J Nucl Med* 1995; 36:2175-2179.
53. Ogawa T, Inugami A, Hatazawa J, Kanno I, Murakami M, Yasui N, et al. Clinical positron emission tomography for brain tumor: comparison of fluodeoxyglucose F 18 and L-methyl- ^{11}C -methionine. *Am J Neuroradiol* 1995; 17:345-353.
54. Sonoda Y, Kumabe T, Tkahashi T, Shirane R, Yoshimoto T. Clinical usefulness of ^{11}C -MET PET and ^{201}Tl SPECT for differentiation of

- recurrent glioma from radiation necrosis. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 1998; 38:342-347.
55. De Witte O, Goldberg I, Wikler D, Rorive S, Damhaut P, Monclus M, et al. Positron emission tomography with injection of methionine as a prognostic factor in glioma. *J Neurosurgery* 2001; 95:746-750.
56. Tsuyuguchi N, Sunada I, Iwai Y, Yamanaka K, Tanaka K, Takami T, et al. Methionine positron emission tomography of recurrent metastatic brain tumor and radiation necrosis after stereotactic radiosurgery: is a differential diagnosis possible? *J Neurosurg* 2003; 98:1056-1064.
57. Chao ST, Suh JH, Raja S, Lee SY, Barnett G. The Sensitivity and Specificity of FDG PET in Distinguishing Recurrent Brain Tumor from Radionecrosis in Patients Treated with Stereotactic Radiosurgery. *Int J Cancer* 2001; 96:191-197.
58. Bruhn H, Frahm J, Gyngell ML, et al. Noninvasive differentiation of tumors with use of localized H-1 MR spectroscopy in vivo: Initial experience in patients with cerebral tumors. *Radiology* 1989; 172:541-548.
59. Luyten PR, Marien AJH, Heindel W, et al. Metabolic imaging of patients with intracranial tumors: H-1 MR spectroscopic imaging and PET. *Radiology* 1990; 176: 791-799.
60. Gill SS, Thomas DG, Van Bruggen N, et al. Proton MR spectroscopy of intracranial tumors: in vivo and in vitro studies. *J Comput Assist Tomogr* 1990; 14:497-504.
61. Sappey-Marini D, Calabrese G, Hetherington HP, et al. Proton magnetic resonance spectroscopy of human brain: applications to

- normal white matter, chronic infarctation, and white matter signal hiperintensities. *Magn Reson Med* 1992; 26:313-317.
62. Fulham MJ, Bizzi A, Dietz MJ, et al. Mapping of brain tumor metabolites with proton MR spectroscopy imaging, clinical relevance. *Radiology* 1992; 185:675-686.
63. Castillo M, Lester Kwock and Suresh K. Clinical Applications of Proton MR spectroscopy. *AJNR Am J Neuroradiol* 1996; 17:1-15.
64. Hyun Kim S, Chang KH, Hee M, Sik H, Chung M, et al. Brain abscess and brain tumor: discrimination with in vivo H-1 MR spectroscopy, *Radiology* 1997; 204:239-245.
65. Glickson JD. Clinical NMR spectroscopy of tumors. Current status and future directions. *Invest Radiol* 1989; 24:1011-1016.
66. McBride DQ, Miller BL, Nikas DL, et al. Analysis of brain tumors using proton magnetic resonance spectroscopy. *Surg Neurol* 1995; 44: 137-144.
67. Castillo M, Kwock L, Kim M. Proton M Spectroscopy of the brain. *Neuroimaging Clinics of North America*. Noviembre 1998.
68. Andrew J, Scott D, Robert W, et al. Focal brain lesions: Effect of Single-voxel proton MR spectroscopic findings on treatment decisions. *Radiology* 1998; 209:73-78.
69. Meng L, Soonmee C, Edmond A, Kopp, et al. High-grade gliomas and solitary metastases: differentiation by using perfusion and Proton Spectroscopic MR imaging. *Radiology* 2002; 222:715-721.

70. Ping H, Jih T, Wei L, Shu S, et al. Brain abscess and necrotic brain tumor: Discrimination with proton MR spectroscopy and diffusion-weighted imaging. *AJNR Am J Neuroradiol* 2002; 23:1369-1377.
71. Lin A, Bluml S, Mamelak AN. Efficacy of proton magnetic resonance spectroscopy in clinical decision making for patients with suspected malignant brain tumors. *J Neurooncol* 1999; 45:69-76.
72. Wald LL, Nelson SJ, Day MR, Noworolski SE, Henry RG, Huhn SL, Chang S, Prados MD, Sneed PK, Larson DA, Wara WM, McDermott M, Dillon WP, Gutin PH, Vigneron DB. Serial proton magnetic resonance spectroscopy imaging of glioblastoma multiforme after brachytherapy. *J Neurosurg* 1997; 87:525-534.
73. Dowling C, Bollen AW, Noworolski SM, McDermott MW, Barbaro NM, Day MR, Henry RG, Chang SM, Dillon WP, Nelson SJ, Vigneron DB. Preoperative Proton MR Spectroscopic Imaging of Brain Tumors: Correlation with Histopathologic Analysis of Resection Specimens. *AJNR Am J Neuroradiol* 2001; 22:604-612.
74. Holodny AI, Ollenschlager M. Diffusion Imaging In Brain Tumors. *Neuroimag Clin N Am* 2002; 12:107-124.
75. Suguhara T, Korogi Y, Tomiguchi S, Shigematsu Y, Ikushima I, Kira T, Liang L, Ushio Y y Takahashi M. Posttherapeutic Intraaxial Brain Tumor: The Value of Perfusion-sensitive Contrast-enhanced MR Imaging for Differentiation Tumor Recurrence from Nonneoplastic Contrast-enhancing Tissue. *AJNR Am J Neuroradiol* 2000; 21:901-909.
76. Krabbe K, Gideon P, Wagn P, et al. MR diffusion imaging of human intracranial tumors. *Neuroradiology* 1997; 39:483-489.

77. Kim YJ, Chang KH, Son IC, et al. Brain abscess and necrotic or cystic brain tumor: discrimination with signal intensity on diffusion-weighted MR imaging. *AJR* 1998; 171:1478-1490.
78. Hein PA, Eskey CJ, Duna JF y Hug EB. Difusión-Weighted Imaging in the Follow-up of Treatde High-Grade Gliomas: Tumor Recurrence versus Radiation Injury. *AJNR Am J Neuroradiol* 2004; 25:201-209.
79. Chan Y, Yeung DK, Leung S, Chan P. Difusión-Weighted Magnetic Resonante Imaging in Radiation-Induced Cerebral Necrosis: apparent Difussion Coefficient in Lesion Components. *J Comput Assist Tomogr* 2003; 27:674-680.
80. Moncada S, Higgs A. The l-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329: 2002-2012.
81. Anggard, E. Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *Lancet* 1994, 343: 1199-206.
82. Morikawa E, Moskowitz MA, Huang Z, Yoshida T, Irikura K, Dalkara T. L-arginine infusion promotes nitric oxide dependent vasodilatation, increases regional cerebral blood flow, and reduces infarction volume in the rat. *Stroke* 1994; 25 (2): 429-35.
83. Gally JA, Montague P, Reeke GN, Edelman GM. The NO hypothesis: Possible effects of a short-lived, rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87:3547-3551.
84. Iadecola C, Pelligrino DA, Moskowitz MA, Lassen NA. Nitric oxide synthase inhibition and cerebrovascular regulation. *J Cereb Blood Flow Metab* 1994; 14: 175-192.
85. Pérez-Neri I, Castro E, Montes S, Boll MC, Bargés-Coll J, Soto-Hernández JL, Ríos C. Arginine, citrulline and nitrate concentrations in the cerebrospinal fluid from acute hydrocephalus patients. *J Chromatogr B* 2006; en prensa.

86. Farrel AJ, Blake DR, Palmer RMJ, Moncada S. Increased concentration of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. *Annu Rheum Dis* 1992; 51: 1219-1222.
87. Milstein S, Sakai N, Brew BJ, Krieger C, Vickers JH, Saito K, Heyes MP. Cerebrospinal fluid nitrite/nitrate levels in neurologic disease. *J Neurochem* 1994; 63: 1178-1180.
88. Ikeda M, Sato I, Yuasa T, Miyatake T, Murota S. Nitrite, nitrate and GMPc in the cerebrospinal fluid in degenerative neurologic diseases. *J Neural Transm (Gen Sect)* 100: 263-267.
89. Zecca L, Rosati M, Renella R, Galimberti M, Ambrosini A, Fariello RG. Nitrite and nitrate levels in cerebrospinal fluid of normal subjects. *Journal of Neural Transmission* 1998; 105: 627-633.
90. H. E. Barksby, S. R. Lea, P. M. Preshaw and J. J. Taylor The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. 2007 British Society for Immunology, *Clinical and Experimental Immunology*, **149**: 217–225.
91. Charles A. Dinarello. Blocking IL-1 in systemic inflammation. *JEM The Rockefeller University* Vol. 201, No. 9, May 2, 2005 1355–1359.
92. Chakrabarti I, Cockburn M, Cozen W, Wang YP y Preston-Martin S. A Population-based description of glioblastoma multiforme in Los Angeles County, 1974-1999. *Cancer* 2005; 14(12):2798-2806.
93. Mendoza A, Cabaalé M y Fernández ME. Comportamiento Anatomopatológico de los Tumores Cerebrales en el Hospital General “Lucía Iñiguez”. Año 2003. *Correo Científico Médico de Holguín* 2004; 8(3):1-6.
94. El Menyawi I, Looareesuwan S, Knapp S, Thalhammer F, Stoiser B, Burgmann H. Measurement of serum nitrite/nitrate concentrations using high-performance liquid chromatography. *Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1998; 706:347-351.

J. TABLAS

Tabla 1. Definición de Variables

Variable	Definición Operacional	Escala de Medición
Niveles séricos de TNF-alfa	Niveles séricos en nanogramos/mililitro	Numérica Continua
Niveles séricos de IL-1 beta	Niveles séricos en nanogramos/mililitro	Numérica Continua
Niveles séricos de IL-6	Niveles séricos en nanogramos/mililitro	Numérica Continua
Niveles séricos de IL-8	Niveles séricos en nanogramos/mililitro	Numérica Continua
Niveles séricos de IL-10	Niveles séricos en nanogramos/mililitro	Numérica Continua
Niveles séricos de IL-12	Niveles séricos en nanogramos/mililitro	Numérica Continua
Tipo de Paciente	<ol style="list-style-type: none"> 1. Recurrencia Tumoral (sobrevida mayor que la median) 2. Radionecrosis o edema inducido por Radiación (sobrevida menor que la mediana) 	Nominal Dicotómica
Sexo	<ol style="list-style-type: none"> 1. Mujer 2. Hombre 	Nominal Dicotómica
Edad	Años cumplidos al momento del diagnóstico o inicio del estudio (controles)	Numérica Discreta
Índice de Masa Corporal	Calculado al momento de la toma de la muestra con la fórmula: $IMC = \text{peso en kg} / \text{altura en m al cuadrado}$	Numérica Continua

Tabla 2. Niveles de Citocinas en ng/dl en Sujetos

	Media	Mínimo	Máximo	DE
IL-12	5.9	4.3	6.6	0.8
TNF-alfa	5.9	4.6	8.0	1.4
IL-10	5.8	5.0	6.6	0.7
IL-6	23.9	6.3	61.3	19.7
IL1-beta	10.0	5.6	18.8	5.2
IL-8	68.4	6.6	276.3	99.9

Tabla 3. Niveles de Citocinas Basales en ng/dl en Pacientes

	Media	Mínimo	Máximo	DE
IL-12	11.3	5.2	37.5	12.9
TNF-alfa	7.4	4.3	13.3	3.1
IL-10	10.1	5.6	27.6	8.6
IL-6	14.8	8.9	36.5	10.7
IL1-beta	15.3	6.1	54.7	19.3
IL-8	35.7	7.5	106.5	36.0

Tabla 4. Comparación de Niveles de Citocinas Basales en ng/dl en ambos grupos

	Sujetos (media)	Pacientes (media)	Valor de p
IL-12	5.9	11.3	0.628
TNF-alfa	5.9	7.4	0.534
IL-10	5.8	10.1	0.101
IL-6	23.9	14.8	0.534
IL1-beta	10.0	15.3	0.836
IL-8	68.4	35.7	0.836

Tabla 5. Niveles de Citocinas a los 3 meses en 3 Pacientes

	Media	Mínimo	Máximo	DE	Mediana
IL-12	6.5	6.1	6.9	0.4	6.3
TNF-alfa	7.2	6.2	8.4	1.1	3.3
IL-10	6.4	5.9	7.4	0.9	6.2
IL-6	18.0	8.2	32.2	12.6	7.9
IL1-beta	9.2	6.7	12.2	2.8	6.5
IL-8	170.1	9.6	267.8	140.1	7.4

Tabla 6. Niveles de Citocinas a los 6 meses en 2 Pacientes

	Media	Mínimo	Máximo	DE	Mediana
IL-12	6.5	6.1	6.9	0.6	6.5
TNF-alfa	7.3	6.2	8.4	1.6	7.1
IL-10	5.9	5.9	5.9	0	5.9
IL-6	20.2	8.2	32.2	17	13.7
IL1-beta	7.8	6.7	8.8	1.5	8.8
IL-8	121.3	9.6	232.9	157.9	232.9

Tabla 7. Comparación de Niveles de Citocinas entre Basal y 3 meses

	Basal (Mediana)	3 meses (Mediana)	Valor de p
IL-12	6.2	6.3	0.593
TNF-alfa	6.9	3.3	0.285
IL-10	6.4	6.2	1.000
IL-6	11.8	7.9	0.285
IL1-beta	6.9	6.5	0.414
IL-8	15.4	7.4	0.285

Tabla 8. Comparación de Niveles de Citocinas entre Basal y 6 meses

	Basal (Mediana)	6 meses (Mediana)	Valor de p
IL-12	6.6	6.5	0.655
TNF-alfa	7.0	7.1	0.180
IL-10	6.5	5.9	0.655
IL-6	12.1	13.7	0.180
IL1-beta	7.8	8.8	0.180
IL-8	15.1	232.9	0.655

COMENTARIOS DE LOS ARTÍCULOS PUBLICADOS

1. **Moreno-Jiménez S**, San Juan D, Lárraga-Gutiérrez JM, Celis MA, Alonso-Vanegas, Ansel DJ. Diffusion tensor imaging in radiosurgical callosotomy. *Seizure* 21:473-477, 2012.

En este trabajo realizamos mediciones de la fracción de anisotropía (FA) en una paciente de 25 años con epilepsia catastrófica antes de una callosotomía por radiocirugía, y posterior a los 3 y 9 meses, además de en 6 sujetos sanos entre 20 y 30 años de edad.

Encontramos una distribución de la FA, en las diferentes regiones del cuerpo calloso de los sujetos sanos, muy similar a la descrita en la literatura. La distribución la FA también fue muy similar entre los sujetos sanos y nuestra paciente con epilepsia en su medición basal.

Posterior a la radiocirugía, encontramos una reducción de la FA en las regiones radiadas, mientras que se mantuvo estable en las no radiadas. De forma paralela a la disminución de la FA, encontramos una disminución del número de crisis epilépticas tanto a los 3 como a los 6 meses. Haciendo un análisis fino sobre los cambios en la difusibilidad en el cuerpo calloso radiado, encontramos que el principal factor para la disminución de la FA, es el incremento de la difusibilidad perpendicular, lo que nos inclina a pensar que esta se debe a una desmielinización, más que a una fragmentación axonal.

De manera anecdótica, podemos comentar que en nuestros pacientes con callosotomía por radiocirugía, no hemos diagnosticado el síndrome de desconexión, que es característico de la callosotomía por microcirugía, probablemente, por la desconexión lenta y progresiva de las fibras. Esto último deberá estudiarse con otro diseño de estudio.

2. Roldán_Valadez E, Ríos C, Motola-Kuba D, Matus-Santos J, Villa AR, **Moreno-Jiménez S**. Age, choline-to-N-acetyl aspartate, and lipids-lactate-to-creatine ratios assemble a significant Cox's proportional-hazards regression model prediction in patients with high-grade gliomas. Br J Radiol 89:20150502, 2016.

Las imágenes convencionales de resonancia magnética (IRM), son consideradas como la "punta del iceberg" en el estudio de pacientes con glioblastoma, ya que se sabe, que pueden existir células tumores en la periferia por invasión microscópica, especialmente en la sustancia blanca.

Los factores pronósticos conocidos en pacientes con glioma de alto grado incluyen edad, estado funcional, localización y tamaño del tumor, histopatología, grado de resección y tratamiento administrado.

En este estudio investigamos el papel de ciertas variables demográficas, pero especialmente, el uso de secuencias de difusión y espectroscopia para determinar si pueden ser parámetros confiables asociados a la supervivencia de los pacientes.

Estudiamos 28 pacientes con gliomas de alto grado tratados, en su mayoría, con el protocolo Stupp.

Estudiamos 20 variables dentro de las cuales se incluyeron 5 índices de metabolitos. Utilizamos análisis de Kaplan-Meier y modelo de análisis de regresión de riesgos proporcionales de Cox. Después de un primer análisis, seleccionamos los tres con el valor de p menor que fueron: Índice Cho/Naa ($p = 0.017$), edad ($p = 0.072$), e índice Lípidos/Lactato/Creatina ($p = 0.109$). Después de un segundo análisis de regresión de Cox con estas tres covariables obtuvimos un valor de $p = 0.028$.

El índice Cho/Naa fue el predictor más fuerte de supervivencia con una log-función de riesgo de 2.672. Este valor nos indica que por cada unidad adicional de este índice, los pacientes

incrementan 2.672 veces la función de riesgo de reportar una muerte, en comparación con los que no mostraron dicho incremento en el índice, controlando todos los demás factores en el modelo. El índice Lípidos/Lactato/Creatina mostró una log-función de riesgo de 0.584; considerando el signo negativo de su valor de beta, este valor de riesgo se puede interpretar como un 41.6% de reducción en el riesgo de reportar una muerte.

Completamos el análisis de Cox con una gráfica de residuales de Schoenfeld para revisar los riesgos proporcionales encontrando que las curvas variaban en una forma no sistemática desde cero.

Uno de los principales hallazgos en nuestro estudio es la evidencia de que el índice Cho/Naa es un biomarcador con un alto impacto en la supervivencia del paciente ($p = 0.028$).

3. Orozco-Morales M, Sánchez-García FJ, Golán-Cancela I, Hernández-Pedro N, Costoya JA, Pérez de la Cruz V, **Moreno-Jiménez S**, Sotelo J, Pineda B. RB mutation and RAS over expression induce resistance to NK cell-mediated cytotoxicity in glioma cells. *Cancer Cell Int* 15:57, 2015.

La tumorigénesis es un proceso de múltiples pasos en los cuales alteraciones genéticas llevan progresivamente a la transformación de células normales en derivados altamente malignos, con ciertas características (“marcas de sello”) conocidas, dos de las cuales han sido propuestas recientemente: desregulación de energía celular, y evitación de destrucción inmunológica.

En los gliomas, frecuentemente se encuentra una alteración en la vía de señalización del oncogen Ras. Por otro lado, el gen supresor Rb regula el ciclo celular la inhibir la progresión hacia la fase S, al inactivas al factor de transcripción E2F, el cual es crítico para la realización del DNA.

Las células asesinas naturales (NK) se consideran como la primera línea de defensa en contra de los tumores. Por este motivo, considerando la expresión del oncogen Ras y la inactivación del Rb, en un modelo *in vitro* de gliomagénesis, exploramos si estas alteraciones genéticas específicas inducen a un genotipo celular compatible con evasión de células de glioma de la citotoxicidad mediada por células NK.

El análisis estadístico se hizo con ANOVA de una vía y prueba post-hoc de Tukey

Las células transformadas *in vitro* fueron inyectadas a ratones y, después del crecimiento tumoral, se analizaron dos líneas celulares que sobrevivieron al efecto citotóxico de las células NK mostrando un incremento en la resistencia a la citotoxicidad mediada por células NK.

Se obtuvieron cuatro tipos de astrocitos transformados: cRb^{loxP/loxP}, Ras^{V12}, cRb^{-/-}, y cRb^{-/-}/Ras^{V12}.

Ras^{V12}, y cRb^{-/-}/Ras^{V12}, tenían el Ras activado, mientras que en cRb^{-/-}, y cRb^{-/-}/Ras^{V12}, eran negativos para la proteína Rb. Los astrocitos primarios cRb^{loxP/loxP}, fueron los que más

rápidamente murieron, mientras que los astrocitos transformados $cRb^{-/-}/Ras^{V12}$, fueron los que más sobrevivieron.

Al ser expuestos los astrocitos transformados a las células NK murinas, encontramos que una mutación de Rb y una sobreexpresión de Ras induce resistencia.

Posteriormente se inyectaron células transformadas Ras^{V12} y $cRb^{-/-}/Ras^{V12}$. A ratones inmunocompetentes, logrando la formación de tumores.

Finalmente, estudiamos el efecto de las células delegadas de Rb y/o sobreexpresión de Ras^{V12} en el genotipo de células inmunológicas de la sangre periférica. En todos los grupos de astrocitos transformados, el porcentaje de células con expresión de células que expresan granzimas.

4. Roldán-Valadez E, Ríos C, Cortez-Conradis D, Favila R, **Moreno-Jiménez S**. Global diffusion tensor imaging derived metrics differentiate glioblastoma multiforme vs normal brains by using discriminant analysis: introduction of a novel whole-brain approach. *Radiol Once* 48:127-136, 2014.

Estos tumores frecuentemente contienen múltiples áreas con características diferentes, de tal manera, que un error de muestreo al hacer una biopsia podría subdiagnosticar el grado de malignidad. Por este motivo, ningún protocolo de estudio de resonancia magnética debería ser solamente morfológico. El glioblastoma es considerado una enfermedad de todo el cerebro.

Nuestro propósito en este estudio fue explorar la capacidad diagnóstica de una evaluación global pancerebral mediante el uso de métricas derivadas del DTI, comparando cerebros de sujetos normales con cerebros con glioblastoma.

Utilizamos una técnica multivariada de análisis discriminante lineal para clasificar a los participantes del estudio en dos grupos, describir las diferencias entre ambos grupos y determinar la importancia de las variables de DTI para discriminar entre ambos grupos.

Se trata de un estudio de casos y controles. El grupo control fue de pacientes sanos. La secuencia de DTI se adquirió con características previamente descritas.

Se calcular 11 métricas derivadas del DTI: difusibilidad media (MD), fracción de anisotropía (FA), difusión isotópica pura (p), difusión anisotrópica pura (q), la magnitud total del tensor de difusión (L), tensor lineal (Cl), tensor planar (Cp), tensor esférico (Cs), anisotropía relativa (RA), difusibilidad axial (AD) y difusibilidad radial (RD), cada uno representando una medida única global de todo el cerebro.

Realizamos un análisis discriminante multivariado, además de un análisis de correlación parcial para calcular el coeficiente de correlación de Pearson (r) controlando el efecto de la edad, sexo y diagnóstico clínico.

La variable dependiente utilizada en el análisis discriminante fue el diagnóstico clínico (pacientes o controles). Las variables independientes fueron las 11 métricas derivadas del DTI y la edad.

Se estudiaron 27 pacientes y 34 controles. El análisis discriminante reveló una función discriminante que de manera significativa diferenció a los cerebros normales de los cerebros con glioblastoma: Wilks lambda = 0.324, $X^2(3) = 38.907$, $p = 0.001$. La variabilidad total no explicada por el modelo fue de 10.49%. Una correlación canónica de 0.822 sugirió que el modelo explica el 67.56% e la variación en la variable de agrupación.

Nosotros encontramos que AD, MD, p, q, CI, RD y FA fueron las funciones que mejor discriminaron entre cerebros sanos y con tumor. El estatus cerebral (cerebro normal vs tumoral) = $-48.295 + 11,443.557 (AD) + 105.124 (CI) + 26.804 (Cs)$. En nuestro estudio, los cerebros normales tuvieron una media de 1.483, mientras que los cerebros tumorales tuvieron una media de -1.334; el punto de corte para la función tuvo un valor calculado de 0.149.

Tras una validación cruzada para presentar el poder de la función discriminante, los resultados revelaron que 92.7% de los participantes fueron correctamente clasificados como cerebros normales o cerebros con tumor, correspondiendo este valor con la precisión predictiva de la función discriminante.

En los histogramas finales de los marcadores D promedio para cada grupo, observamos que no existe una sobreposición de las mismas, demostrando la efectividad de la función discriminante.

Conclusiones:

El protocolo de investigación original no se logró concluir debido a cuestiones de logística y se presentan solamente los resultados preliminares de la primera fase.

El artículo llamado “Diffusion tensor imaging in radiosurgical callosotomy” nos permitió concluir que la medición seriada de DTI podría ser útil para evaluar la degeneración axonal después de callosotomía por radiocirugía. También nos permitió concluir que a largo plazo, el efecto de la radiocirugía sobre las fibras blancas, es mediante la desmielinización (incremento de la difusibilidad perpendicular).

El artículo “Choline-to-N-acetyl aspartate and lipids-lactate-to-creatine ratios together with age assemble a significant Cox’s proportional-hazards regression model for prediction of survival in high-grade gliomas” nos permitió concluir que un mayor índice de Cho/Naa preoperatorio, un menor índice de LL/Cr, y la edad son predictores significativos de sobrevida.

El artículo “Global diffusion tensor imaging derived metrics differentiate glioblastoma multiforme vs normal brains by using discriminant analysis: introduction of a novel whole-brain approach” nos permitió concluir que existe una aplicabilidad clínica de los biomarcadores para realizar modelos predictivos para diferenciar tejido normal de tejido tumoral. Debido al gran número de variables cualitativas y cuantitativas que deben analizarse en IRM, la técnica de análisis multivariado de análisis discriminante, podría ayudar.

El artículo “RB mutation and RAS overexpression induce resistance to NK cell-mediated cytotoxicity in glioma cells” nos permitió concluir que la transformación de los astrocitos (pérdida de Rb, la sobreexpresión de Ras, a ambos) indujo cambios fenotípicos y funcionales asociados con la resistencia a la citotoxicidad mediada por células NK. Además, la transferencia de astrocitos transformados dentro de ratones

aumentó la resistencia a la citotoxicidad mediada por células NK, lo que sugiere que los cambios específicos en un gen supresor tumoral (Rb) y un proto-oncogen Ras son suficientes para conferir resistencia a la citotoxicidad mediada por células NK en células de glioma y, por lo tanto, proporcionar una idea de la capacidad de las células tumorales para evadir la respuesta inmune.