

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**“DETERMINACIÓN DEL ANTÍGENO KI67 Y DEL
GEN P53 COMO FACTORES PRONÓSTICO DE
SOBREVIDA EN PACIENTES CON
GLIOBLASTOMA MULTIFORME”**

KAREN MAGDALY CORTEZ ALVARADO

Tesis para optar el Título Profesional de
Licenciada en Biología

Lima, Perú

2016

DEDICATORIAS

A mis padres: Jorge y Luz, quienes fueron mi fortaleza de principio a fin durante mi carrera universitaria; ustedes que fueron testigos de mis caídas, lloraron conmigo y en mis triunfos celebraron conmigo, a ustedes que vivieron conmigo todas esas noches de estudio; a ustedes, les debo todo lo que soy y lo que seré.

A mis hermanos: Jorge y Gustavo; aunque tenemos diferentes personalidades y diferentes formas de ver la vida, los quiero con todo mi corazón, y espero seguir siendo el mejor ejemplo para ustedes.

A los profesores que fomentaron en mí ese interés que solo quien decidió seguir una carrera de Ciencias comprende: ser curioso, interesarse, leer, investigar, conocer y aprender.

A todos los que me apoyaron a escribir y concluir esta tesis. Para ellos, esta dedicatoria, por todo el apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A mis profesores de la Facultad de Ciencias Biológicas, quienes incentivaron en mí las ganas de investigar y apasionarme por hacer ciencia.

A mí querido profesor Cesar Puicón, porque no hay mejor sensación que la de volver a mi casa de estudios después de un tiempo y encontrarlo, siempre dispuesto a ayudarnos en aquellas fórmulas estadísticas que olvidamos con el paso del tiempo. Pero más allá de todo, un gran amigo, al cual siempre recordaré con mucho afecto.

A mi profesor, Hugo Gonzales, ya que son interminables las anécdotas que siempre recordaremos sus alumnos, pero siempre lo recordaré como aquel profesor que nos trató desde el principio como adultos y nos hizo entender que la investigación está más allá de solo aprender los interminables “papers” de memoria, con usted aprendimos a encontrarle el verdadero sentido a la investigación científica.

Un agradecimiento especial al Departamento de Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN) por permitirme realizar mi tesis dentro de sus instalaciones, al Dr. Carlos Altamirano por el apoyo incondicional y la confianza depositada en mí para el manejo de toda la información recibida. Al Dr. Sandro Casavilca por ese espíritu de siempre querer investigar y que llegué a admirar. A la Dra. Pamela Garcia-Corrochano por permitirme trabajar en su área de investigación y compartir conmigo muchos momentos gratos.

A mis amigos, que compartieron conmigo esos años de estudio, de amanecidas, de exámenes y de prácticas, por todos los momentos, gracias.

INDICE

| | |
|---|----|
| INDICE..... | 4 |
| I. INTRODUCCIÓN | 8 |
| II. MARCO TEÓRICO | 10 |
| 2.1 Clasificación de los tumores del SNC | 10 |
| 2.2 Diagnóstico y tratamiento de los GBM | 11 |
| 2.3 Oncosupresor de tumores: gen p53 | 11 |
| 2.4 Antígeno ki67 y su relación con los GBM | 12 |
| III. ANTECEDENTES | 13 |
| IV. HIPÓTESIS | 15 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 16 |
| 5.1 Lugar de ejecución..... | 16 |
| 5.2 Tipo y diseño de Investigación | 16 |
| 5.2.1 Tipo de Investigación | 16 |
| 5.2.2 Diseño de la Investigación..... | 16 |
| 5.3 Variables | 17 |
| 5.4 Operacionalización de variables..... | 17 |
| 5.5 Muestreo | 18 |
| 5.6 Procedimiento..... | 18 |
| 5.6.1 Obtención de historias clínicas | 18 |
| 5.6.2 Revisión de historias clínicas | 18 |
| 5.6.3 Análisis Inmunohistoquímico..... | 19 |
| 5.7 Análisis de Datos | 20 |
| 5.8 Aspecto ético | 20 |
| VI. RESULTADOS | 21 |
| VII. DISCUSIÓN | 22 |
| VIII. CONCLUSIONES | 23 |
| IX. REFERENCIAS CITADAS..... | 24 |
| X. ANEXOS | 28 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| <i>Fig.1</i> _____ | 29 |
| <i>Fig.2</i> _____ | 29 |
| <i>Fig.3 Comparación de los tiempos de sobrevida según la expresión del gen P53 y AgKi67 alto</i> _____ | 30 |
| <i>Fig.4 Comparación de los tiempos de sobrevida según la no expresión del gen P53 y AgKi67 moderado</i> _____ | 30 |
| <i>Fig.5 Tiempo de sobrevida según el sexo</i> _____ | 31 |

RESUMEN

Objetivos. Determinar la influencia de los marcadores: antígeno Ki67 y del gen p53 como factores pronóstico independiente en la sobrevida de los pacientes con Glioblastoma Multiforme. **Materiales y métodos.** Se revisó un total de 150 casos de pacientes con diagnóstico preliminar de Glioblastoma Multiforme (GBM) atendidos en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas, entre los años 2008 y 2013 y se seleccionaron 60 casos que cumplían con los criterios de inclusión requeridos, información clínico patológica y seguimiento adecuado. **Resultados.** La media de edad es de 51 años (8-73 años), conformado por 34 hombres (56.7%) y 26 mujeres (43.3%). La mediana de sobrevida global (SG) es menor en el grupo de pacientes que sobreexpresaron el antígeno Ki67 ($\geq 20\%$), frente a los pacientes que tuvieron niveles de expresión moderada del antígeno ($\geq 10\%$). (26.5 vs 40 meses). Asimismo, se evidencia que la SG es mayor en los pacientes que expresan positivamente el gen p53 ($>20\%$), frente a los pacientes que no llegaron a expresarlo. (40 vs 30 meses). **Conclusiones.** Tanto la expresión del antígeno ki67 como la expresión del gen p53 se pueden determinar como factores pronóstico de la sobrevida de pacientes que hayan sido diagnosticados con GBM con el fin de mejorar la calidad de vida de estos pacientes dándoles la posibilidad de recibir un tratamiento más específico acorde a los valores de estos marcadores inmunohistoquímicos.

Palabras clave: Glioblastoma, p53, ki67, sobrevida

ABSTRACT

Objectives. To evaluate the influence of markers: Ki67 antigen and p53 gene as independent prognostic factors in the survival of patients with Glioblastom Multiform.

Materials and methods. A total of 150 cases of patients with a preliminary diagnosis of Glioblastom Multiform (GBM) treated at the National Institute of Neoplastic Diseases between 2008 and 2013 were reviewed and 60 cases were selected that satisfy the inclusion criteria required, clinical pathological information and adequate follow-up information.

Results. The mean age is 51 years (8-73 years), made up of 34 men (56.7%) and 26 women (43.3%). The median overall survival (OS) was lower in the group of patients who overexpressed the Ki67 antigen ($\geq 20\%$), compared to the patients who had moderate levels of antigen expression ($\geq 10\%$). (26.5 vs. 40 months). As well evidenced that the OS is higher in patients who positively express the p53 gene ($> 20\%$), compared to patients who did not express it. (40 vs. 30 months).

Conclusion. Both, the expression of the ki67 antigen and the expression of the p53 gene could be determined as prognostic factors for the survival of patients who have been diagnosed with GBM in order to improve the quality of life of these patients giving them the possibility of receiving a more specific treatment according to the values of these immunohistochemically markers.

Key words: Glioblastom, p53, ki67, survival

I. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica a los Tumores del Sistema Nervioso Central (SNC) en cuatro grados según la malignidad del tumor. El grado I y II corresponden a aquellos tumores con bajo potencial proliferativo y en los cuales es posible la cura después del tratamiento adyuvante que se le proporcione al paciente, mientras que los tumores clasificados dentro de los grados III y IV del SNC son aquellos de peor pronóstico y se relacionan en su mayoría con una limitada evolución del paciente al tratamiento post operatorio (Radioterapia y/o quimioterapia), reacciones desfavorables como convulsiones o rechazo al tratamiento adyuvante y generalmente desenlaces mortales. El presente estudio se realizó con pacientes que fueron diagnosticados con tumores de alto grado (grado IV) o Glioblastoma Multiforme. (Louis et al, 2007; Yamal et al, 2008).

El Glioblastoma Multiforme (GBM) representa la neoplasia cerebral más frecuente (alrededor de la mitad de los tumores del cerebro) y la de mayor mortalidad. Es más frecuente entre la quinta y sexta década de la vida y tiene una ligera predisposición por el sexo masculino (Gordon-Firing 1995; Yamal et al, 2008). La tasa de incidencia de los tumores del sistema nervioso central (SNC) en Estados Unidos de Norteamérica es alrededor de 11,4 casos por 100 000 personas/año, y representa el 2,4% de las muertes por cáncer (Louis et al, 2007). Mientras que en nuestro país, solo en Lima Metropolitana la tasa de incidencia estandarizada es de 7,0 casos por 100 000 personas/año y representa el 3,4% de las muertes por cáncer (Registro de Cáncer de Lima Metropolitana, 2014). Menos del 3% de todos los pacientes con diagnóstico de GBM sobreviven más de cuatro años y la supervivencia promedio es de seis meses (Louis et al, 2007).

A nivel mundial se han estudiado las relaciones entre la expresión del gen supresor de tumores: p53 y el grado tumoral, mientras que otros estudios correlacionan la expresión del antígeno Ki67 con el grado y estadio tumoral (Heegaard et al, 1995; De Angelis 2001; Grotzer et al, 2001; Isolan 2005).

Por lo tanto, el objetivo de este estudio retrospectivo fue determinar la influencia de la expresión del Antígeno Ki67 y del gen p53 como factores pronóstico en la sobrevida de pacientes con Glioblastoma Multiforme (GBM) considerando su asociación con variables clínico-patológicas, sobrevida libre de progresión y sobrevida global. Con la

finalidad de mejorar la identificación del pronóstico, adecuar el tratamiento para los pacientes e incrementar los conocimientos dentro de nuestra población que padece de esta enfermedad.

El Registro de Cáncer de Lima Metropolitana 2004-2005 encuentra 1,146 casos nuevos de tumores del encéfalo y sistema nervioso con una tasa de incidencia estandarizada de 6,9 – 7,0 por 100.000 lo que representa el 3,8% de todas las neoplasias malignas. Anualmente se diagnostican aproximadamente 40 casos nuevos de Glioblastoma Multiforme (GBM) al año en el Instituto de Enfermedades neoplásicas (INEN), institución que atiende al 40% de la población de cáncer de Perú (Registro de Cáncer de Lima Metropolitana 2014).

En nuestro país el limitado pronóstico asociado con esta neoplasia conlleva a que se considere un problema epidemiológico y de salud pública, debido a la escasa información que existe al respecto. Actualmente los resultados de inmunohistoquímica como la expresión del antígeno Ki67 y la mutación del gen p53 se incluyen en el diagnóstico de esta enfermedad, pero aún no hay datos suficientes ni estudios realizados para que sean considerados como factores pronóstico de la sobrevida en pacientes con GBM. (Castañeda et al, 2015).

Por esta razón, al determinar la relación entre estos marcadores inmunohistoquímicos (Antígeno Ki67 y del gen p53) como factores pronóstico independiente en la sobrevida de los pacientes con Glioblastoma Multiforme se busca mejorar tanto el diagnóstico como un tratamiento más específico para cada paciente. Asimismo el futuro de este tipo de terapia y de abordaje en los casos de gliomas malignos, está dirigido a transformar los marcadores tumorales (inmunohistoquímicos) en un punto a favor en el tratamiento de esta neoplasia, ya que a pesar de los grandes esfuerzos que se han hecho a nivel mundial para aumentar el tiempo de recaída del paciente frente al GBM, la mayor supervivencia alcanzada en algunos países no llega a los cuatro años. (Louis et al, 2007; Dubrow et al, 2011).

II. MARCO TEÓRICO

El glioblastoma Multiforme (GBM) es el tumor maligno primario del sistema nervioso central (SNC) más común en adultos (supone más del 50%) y se asocia invariablemente a un mal pronóstico. Solo el 33% de los pacientes sobrevive al año y el 5% de los pacientes llegan a vivir más de 5 años tras el diagnóstico (Preston 1999; Kleihues 2000).

Los GBM pueden comprometer cualquier estructura neuroanatómica, pero en adultos es más común en los hemisferios cerebrales, mientras que en los niños lo es en la fosa posterior. Su crecimiento infiltrativo es extremadamente rápido. Histológicamente, se diferencia de los demás tumores primarios que afectan al SNC por presentar cambios histológicos, como pleomorfismo celular, necrosis con células en pseudoempalizada en la periferia, atipia nuclear y microhemorragias (Heegaard et al, 1995; Grotzer et al, 2001). La denominación multiforme se debe a la gran heterogeneidad que lo caracteriza con variados patrones y rasgos citológicos. (De Angelis, 2001; Isolan 2005).

2.1 Clasificación de los tumores del SNC

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica los tumores primarios del sistema nervioso central en adultos por criterios histopatológicos en (I–IV grados) como se detalla a continuación (Preston 1999; Louis et al, 2007):

- **El grado I de la OMS** incluye lesiones de bajo potencial proliferativo, con frecuencia su naturaleza es de perfil bajo y es posible la cura después de la resección quirúrgica sola. (Astrocitoma Pilocítico).
- **El grado II de la OMS** incluye lesiones que por lo general son infiltrantes y de actividad mitótica baja, pero recidivan con mayor frecuencia que los tumores malignos de grado I después de la administración de tratamiento local. Algunos tipos de tumores tienden a avanzar a grados más altos de malignidad. (Astrocitoma difuso).
- **El grado III de la OMS** incluye lesiones con hallazgos histológicos de neoplasia maligna, incluso atipia nuclear y aumento de la actividad mitótica. Estas lesiones tienen características histológicas de anaplasia y capacidad de infiltración. Habitualmente, se tratan con terapia adyuvante intensiva. (Astrocitoma Anaplásico).

- **El grado IV de la OMS** incluye lesiones con actividad mitótica, propensas a necrosis y, en general, se relacionan con evolución pre y posoperatoria rápida y con desenlaces mortales. Las lesiones habitualmente se tratan con terapia adyuvante intensiva. En este grado se encuentra el denominado **Glioblastoma Multiforme (GBM)**.

2.2 Diagnóstico y tratamiento de los GBM

En la actualidad, el diagnóstico de esta enfermedad se obtiene por estudio de microscopía de luz e inmunohistoquímica del espécimen obtenido por biopsia o por resección total o subtotal. En cuanto al tratamiento del tumor, se basa en la neurocirugía, cuyos objetivos son reducir el efecto de masa de la tumoración que ocasiona obstrucción, mejorar la circulación del líquido cefalorraquídeo y lograr la mayor resección tumoral posible, lo cual tiene significado pronóstico, (Cohen et al, 1995; Nejat et al, 2008) seguido de quimioterapia prerradioterapia con diferentes esquemas para lograr mayor reducción tumoral y la radiosensibilización del tumor. Por último, se utiliza radioterapia al tumor residual con 54 a 56 Gy, excepto en pacientes menores de tres años (López- Aguilar et al, 1997).

En general, los estudios recientes nos han ayudado a llegar a varias conclusiones sobre el tratamiento de este tumor. Principalmente, se ha demostrado que el uso de la monoterapia con algunos de los medicamentos utilizados no lleva a resultados significativos, debido a que las células tumorales poseen diferentes vías de señalización. Esto puede explicar la respuesta insatisfactoria ante la monoterapia, ya que la actividad de vías alternas, aparte de las intervenidas por los medicamentos, van a llevar a la proliferación y a la supervivencia celular; además, pueden generar procesos angiogénicos, lo cual, en el caso del glioblastoma multiforme, es de suma importancia, ya que son masas con tasas mitóticas muy elevadas y requieren ser muy vascularizadas. (López Aguilar et al, 1997; Nejat et al, 2008).

2.3 Oncosupresor de tumores: gen p53

El gen p53 es considerado por muchos autores como "el guardián del genoma". A partir de este gen se sintetiza una proteína, que lleva el mismo nombre y se activa cuando la célula se dispone a dividirse, para vigilar la secuencia normal de acontecimientos

genéticos que permiten la proliferación celular. Si el material genético de la célula resulta dañado o si algún sistema de control se desajusta, esta lo detecta e intenta restaurarlo. Si la lesión no es grave, la p53 detiene la división celular y activa los genes reparadores del ADN. Si la p53 estima que el daño es irreparable entonces ordena que se pongan en marcha los mecanismos genéticos para que la célula entre en apoptosis o muerte celular programada. (Sydmonds et al, 1994).

Si este gen p53 sufre alguna mutación, no permite que la célula sea eliminada mediante la muerte programada, tampoco se ocupa de reparar los daños en el ADN y da lugar al inicio del proceso tumoral. Este gen es el más frecuentemente mutado en los cánceres humanos, más de un 50 % de los tumores tienen genes p53 anormales, produciéndose una proteína alterada (Perry 1993; Funk et al, 1997).

2.4 Antígeno ki67 y su relación con los GBM

El antígeno ki67 es una proteína nuclear no histona que se expresa en todas las fases del ciclo celular (G1, S, G2 y M) excepto en G0. Es una proteína nuclear de gran tamaño con numerosos dominios repetidos que interviene en el mantenimiento del ciclo celular, Es considerado un marcador de la proliferación de células neoplásicas (Tihan et al, 2000). Su detección se realiza por inmunohistoquímica (Johannessen 2006). La determinación de ki67 permite diferenciar grupos de mayor agresividad, que justificaría en ellos una terapia más agresiva que la que le correspondería por sus características de estadio y grado (Heegaard et al, 1995; Isolan, 2005).

III. ANTECEDENTES

La expectativa de vida actual para los pacientes diagnosticados con GBM es muy corta y depende de varios factores tales como la histología, la localización en tallo cerebral (López-Aguilar et al, 1997), los factores de crecimiento celular (sobrexpresión de factores de crecimiento) (López-Muñiz et al, 2000; Gutmann et al, 2003), el índice mitótico (Thorp 1997; Hilton 1998) y la expresión de los antígenos de proliferación como el Ki67, así como la expresión de la mutación del gen P53 (Montine et al, 1994).

La expresión del antígeno ki67 se correlaciona bien con el grado y estadio tumoral. Diversos estudios han demostrado que la expresión de ki67 es un marcador pronóstico independiente de recidiva y progresión (Isolan 2005). Por otra parte (Heegard et al, 1995) encontró que los pacientes que expresaban el antígeno ki67 en más del 10% de sus células tumorales, tenían una supervivencia media de 23.5 y 26.5 meses, respectivamente, mientras que la supervivencia media general era de 4.4 años para pacientes pediátricos.

Tradicionalmente se ha considerado que los pacientes con astrocitoma de alto grado, subgrupo glioblastoma multiforme tienen peor pronóstico; de acuerdo con (Lopez-Aguilar, 2010), no existió diferencia estadísticamente significativa al comparar el grupo de pacientes con astrocitoma anaplásico y glioblastoma multiforme. Sin embargo, 90 % de los pacientes con glioblastoma multiforme sobreexpresaron Ki67, mientras que solo 30 % de los que tuvieron astrocitoma anaplásico lo hicieron; encontraron que el riesgo para una histología agresiva (glioblastoma multiforme) cuando se sobreexpresa Ki67 es seis veces mayor.

En otro estudio (Hilton et al, 1998) analizaron una cohorte de 123 pacientes adultos, demostrando disminución en la sobrevida de los pacientes que expresaban Ki67 en comparación con quienes no lo hacían ($p = 0.04$). La positividad para Ki67 en astrocitomas ha sido asociada con comportamiento más agresivo y con más alto riesgo de progresión; estos resultados indican que realizar la inmunohistoquímica para Ki67 predice un patrón de sobrevida en pacientes con tumores astrocitarios, lo cual conlleva a estratificar de una manera más acuciosa a los pacientes con astrocitoma que tradicionalmente han sido considerados como de bajo riesgo, ya que la histopatología convencional parece ser limitada y, por lo tanto, ya no puede ser valorada como suficiente para el diagnóstico y pronóstico de estos pacientes. (López-Aguilar, 2010).

Asimismo, en los últimos años se han estudiado las relaciones entre el estado del gen p53, a nivel de mutación y expresión, y el grado tumoral. En las primeras investigaciones realizadas por (Shiraishi et al, 2002) analizaron la relación entre la mutación del gen p53 sobre la supervivencia global de pacientes con GBM, y la asociación con la edad de los pacientes. Sus resultados concluyeron en que no existía una diferencia significativa entre la edad de los pacientes sobre la mutación/no mutación del gen p53, y también concluyeron que la mutación del gen p53 no tenía relación con la supervivencia global de los pacientes con GBM que participaron en su estudio. Pero el hallazgo más importante realizado por estos investigadores determinó que la diferencia en las localizaciones de mutación del gen p53 sugiere que esta diferencia de localización podría contribuir no solo a la tumorigénesis (como un evento temprano), sino también a la malignidad de la progresión (como un evento tardío).

Mientras que, investigadores como (Ruano, 2009) encontraron que los tumores de bajo grado que recurrían como astrocitomas anaplásicos, se caracterizaban por presentar mutaciones de p53 y ser positivos inmunológicamente. Otra publicación que generó controversia acerca de las diferentes mutaciones de estas neoplasias fue realizada por (Idbaih et al, 2007), quienes publicaron que los tumores de bajo grado que presentaban recidivas como glioblastomas, generalmente, mantenían su p53 intacto y eran negativos inmunológicamente. Estos hallazgos indican que los astrocitomas de bajo grado que evolucionan a grados más indiferenciados, lo hacen a través de dos vías: la primera, a

Astrocitomas anaplásicos y, posteriormente, a glioblastomas con p53 mutado, y la otra, directamente a glioblastomas con p53 no mutado.

En el estudio realizado por (Ruano, 2009), se evaluaron 194 pacientes con diagnóstico de glioblastoma primario y se sometieron a cirugía para resección tumoral. Además, se les administró quimioterapia y radioterapia cuando había indicación de hacerlo.

Posteriormente, se hicieron pruebas con anticuerpos contra p53, y otros factores. La presencia o la ausencia de estos factores se relacionaron con la supervivencia de los pacientes. Se identificó la mutación p53 en 11,2% de los especímenes y se encontró en 60% de los especímenes que marcaron positivo para p53. Las conclusiones se enfocaron en describir cuál de los factores anteriormente nombrados generaba una diferencia significativamente estadística en la supervivencia de los pacientes. Los hallazgos en relación con los marcadores mostraron que los glioblastomas con presencia de p53 tenían un pronóstico más pobre.

IV. HIPÓTESIS

- La sobreexpresión del antígeno ki-67 y la expresión del gen p53 están relacionados con una baja sobrevida en pacientes con Glioblastoma Multiforme.

MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Lugar de ejecución

Este proyecto se realizó dentro de las instalaciones del Instituto de enfermedades Neoplásicas (INEN) en el centro de Investigación en Cáncer “Maes Heller”.

5.2 Tipo y diseño de Investigación

5.2.1 Tipo de Investigación

El presente estudio es observacional descriptivo y analítico de una serie de casos retrospectiva.

5.2.2 Diseño de la Investigación

La población de estudio la conformaron 150 pacientes con diagnóstico preliminar de Glioblastoma Multiforme (GBM) atendidos en el INEN, dentro del periodo comprendido entre los años 2008 y 2013, se revisaron y analizaron las historias clínicas y estudios histopatológicos de cada paciente dentro de este periodo.

Criterios de inclusión:

- Pacientes con historia clínica completa hecha en el INEN.
- Pacientes con estudio inmunohistoquímico completo: GFAP (Glial Fibrilar Acida Proteína), p53, Ki-67, CD34, o como mínimo, el p53 y ki-67.

Criterios de exclusión:

- Pacientes con historias clínicas incompletas o con estudios y/o análisis realizados en otra institución.
- Pacientes con estudio inmunohistoquímico incompleto.

5.3 Variables

- **Variable independiente;**
 - Inmunoexpresión de Ki67
 - Inmunoexpresión de p53

- **Variable dependiente;**

Cuantitativas:

- Edad

Cualitativas:

- Sexo
- Nivel Karnofsky
- Localización del tumor
- Grado histológico según la clasificación de la OMS.

- **Escala de medición:**

Las escalas de medición usadas en las variables son de orden nominal y ordinal.

5.4 Operacionalización de variables

Para la operacionalización de las variables se empleó el programa estadístico IBM-SPSS versión 24. El tiempo de seguimiento para estimar la sobrevida global comprende desde la fecha de cirugía hasta la fecha de muerte o último control. Las curvas de sobrevida se calcularon por el método de Kaplan-Meier, y la comparación entre curvas de diferentes categorías de las características se generó mediante log-rank test. Para el análisis multivariado de supervivencia se empleó la regresión de Cox. Se consideró una diferencia significativa al valor $p < 0.05$.

- Instrumentos de Investigación:
 - Base de datos diseñada por el investigador (Anexo 1.)

- Historias clínicas de los pacientes diagnosticados con GBM
- Registro de los resultados de los exámenes histopatológicos con diagnóstico de GBM.
- Registro de los resultados de Inmunohistoquímica validados por los especialistas de Patología de INEN.

5.5 Muestreo

- La población de estudio correspondió a todos los casos diagnosticados con Glioblastoma Multiforme (GBM) en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN) entre los años 2008 y 2013: ciento cincuenta pacientes (150), de los cuales sesenta (60) pacientes cumplieron con los requisitos de inclusión previamente mencionados.
- Se utilizaron las historias clínicas de los pacientes hospitalizados con el diagnóstico compatible según Resonancia Magnética (RMN) de Glioma de Alto Grado (GBM) que fueron intervenidos dentro del INEN y que cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión previamente mencionados.

5.6 Procedimiento

5.6.1 Obtención de historias clínicas

En el departamento de Estadística del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN), se obtuvieron las historias clínicas de todos los pacientes con diagnóstico de Glioblastoma Multiforme entre los años 2008 y 2013.

5.6.2 Revisión de historias clínicas

- De la revisión de las historias clínicas de pacientes con GBM, se evaluaron los datos de aquellos pacientes que cumplían con los criterios de selección, en un promedio de 20 historias clínicas diarias, para el registro en una ficha de recolección de datos diseñada para este estudio.

- Se identificaron 150 casos nuevos con diagnóstico clínico de GBM atendidos en el INEN; se seleccionaron a 60 pacientes con resultado anatómopatológico de GBM completos sometidos a resección quirúrgica (total o subtotal) y con información clínica y seguimiento adecuado.
- Se descartaron aquellos casos que no cumplieron con los criterios de inclusión:
 - a) Pacientes con historia clínica completa hecha en el INEN.
 - b) Pacientes con estudio inmunohistoquímico completo: Expresión/no expresión del antígeno Ki67 y/o Mutación/ no Mutación del gen p53.
- Posteriormente se excluyeron a aquellos pacientes que presentaban tumores localizados en ganglios basales y en fosa posterior, así como los que fallecieron por complicación post-operatoria.

5.6.3 Análisis Inmunohistoquímico

- Con los casos ya seleccionados, un patólogo experto del Departamento de Patología del Instituto Nacional de Neoplasias, utilizando un microscopio óptico, observó las placas histológicas, teñidas con hematoxilina-eosina con el objetivo de confirmar el diagnóstico histopatológico de cada caso, y se seleccionó el bloque más representativo en los casos en que existía más de un bloque de parafina.
- Se utilizó el método de polímeros con recuperación antigénica inducida con calor. Las secciones de los bloques de parafina se sumergieron en 10-mM de citrato de sodio en ebullición a pH de 6.5 por 2 minutos. Posteriormente se utilizó un panel de 9 anticuerpos.
- Paralelamente, se utilizaron controles positivos de muestras de Gliomas en los que previamente se había demostrado positividad para Ki-67 y positividad para el anticuerpo p53. Se utilizó como control negativo, cortes de las mismas muestras del estudio en las cuales se reemplazó el anticuerpo primario por PBS. Tanto para p53 como para Ki-67, se utilizaron anticuerpos monoclonales de ratón, RTU.

- Una vez realizada la inmunohistoquímica, las láminas teñidas se numeraron según el número de molde correspondiente y se etiquetaron especificando el anticuerpo utilizado. Luego, se buscaron microscópicamente áreas representativas a un aumento de 10x y posteriormente se fotografiaron a un aumento de 40x. Los campos representativos fueron determinados por áreas con un mayor número de células específicas para GBM .
- En los casos en que se contó con muchos segmentos representativos, se seleccionó el que presentó mayor inmunomarcación. De la zona seleccionada, se obtuvo una foto con el programa Micrometrics SE Premium, y luego se analizó en el software ImageJ, lo que permitió realizar el conteo de células teñidas.
- Para evaluar la tinción de p53 y Ki-67, se contabilizó sin considerar intensidad, tinción nuclear de las células epiteliales con color café. El porcentaje de tinción nuclear fue evaluado cada 1000 núcleos en cada caso. El índice proliferativo para el antígeno ki67 se evaluó en tres cortes: expresión baja $\geq 5\%$, expresión moderada $\geq 10\%$ y expresión alta $\geq 20\%$. Mientras que la sobre-expresión del gen p53 se consideró positiva sobre el 20% del total de la muestra; estos valores se consideraron de acuerdo al protocolo estandarizado por el área de patología del INEN.

5.7 Análisis de Datos

Los resultados se analizaron e interpretaron utilizando el programa estadístico SPSS versión 24, para la estimación de la sobrevida global y la comparación de estos dos marcadores inmunohistoquímicos sobre la sobrevida de los pacientes.

5.8 Aspecto ético

Las bases de datos que se elaboraron no incluyen la identidad de los pacientes ni datos personales, y la información obtenida se mantendrá en completa confidencialidad, siendo la única responsable del manejo de los datos recopilados la autora de la presente tesis. Este proyecto está aprobado por el Comité Revisor de Protocolo y el Comité de Ética del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN).

VI. RESULTADOS

La población de estudio la conformaron 60 pacientes con Glioblastoma Multiforme. La media de edad fue de 51 años (8-73 años), incluyó 34 hombres (56.7%) y 26 mujeres (43.3%). La ubicación tumoral más frecuente fue: frontal en 27 casos (45%), temporal en 18 casos (30%), parietal en 10 casos (16.7%) y occipital en 5 casos (8.3%).

El análisis de este estudio encuentra que la expresión moderada del antígeno Ki67 se encuentra asociada con un mayor tiempo de sobrevida global frente a los pacientes que sobreexpresaron (expresión alta) este antígeno (40 vs 26.5 meses). (Fig. 1,3 y 4).

En cuanto a la expresión del gen p53 en estos pacientes se evidencio un mayor tiempo de sobrevida global en los pacientes que expresaron este gen frente a los pacientes que no lo expresaron (40 vs 30 meses). (Fig. 2, 3 y 4).

Respecto al análisis por sexo, el mejor pronóstico encontrado fue para los varones, pero esta asociación desaparece en el análisis multivariado donde la diferencia ya no es significativa, alcanzando ambos 40 meses en la sobrevida global (Fig. 5).

VII. DISCUSIÓN

En varios estudios la positividad para Ki67 en astrocitomas ha sido asociada con un comportamiento más agresivo y con más alto riesgo de progresión. En uno de las primeras investigaciones realizadas por Heegard et al. (1995), Encontraron que los pacientes que expresaban el antígeno ki67 en más de 3% de sus células tumorales, tenían una supervivencia media de 23.5 y 26.5 meses mientras que en este estudio se demostró que la supervivencia global es mayor para los pacientes que expresaron el antígeno Ki67 en niveles moderados frente a los que expresan el antígeno ki67 en niveles altos (40 y 26.5 meses respectivamente).

Asimismo el grupo de investigación liderado por Hilton et al. (1998) analizaron una cohorte de 123 pacientes adultos, demostrando disminución en la sobrevida de los pacientes que expresaban ki67 en comparación con quienes no lo hacían, esto podría explicar por qué la sobrevida global en nuestra investigación no supera los 40 meses en el caso de los pacientes que expresaron el antígeno en niveles moderados, y esto se debería a que este tipo de Neoplasia es el más agresivo dentro de su clasificación según la OMS y todos los pacientes sometidos a este estudio expresaron este antígeno a diferentes niveles, ya sea en niveles moderados o altos, pero no se tuvo a ningún paciente que no expresará este antígeno.

Respecto a la evaluación del gen p53 como factor pronóstico de la enfermedad, ciertos estudios evaluaron la relación de la mutación de este gen sobre la sobrevida global de los pacientes, como Shiraishi et al. (2002) los cuales concluyeron en su estudio que la mutación del gen p53 no tenía relación con la sobrevida global; en cambio Ruano et al. (2009) analizo la mutación de p53 en 11.2% de los especímenes analizados y encontró 60% de ellos que expresaron

Positivamente para este gen, determinando que la expresión de p53 en neoplasias como el GBM se traduce en pacientes con un pronóstico de sobrevida menor a los que no lo expresaron.

En esta investigación se evidencia que la expresión del gen p53 podría considerarse como un factor pronóstico de la sobrevida en pacientes con GBM debido a que la sobrevida global en los pacientes analizados fue mayor en 10 meses frente a los que no llegaron a expresar este gen (40 vs 30 meses).

VIII. CONCLUSIONES

- 1) Se demuestra que la expresión moderada del antígeno Ki67 está asociado a un mayor tiempo de sobrevida en pacientes con Glioblastoma Multiforme.
- 2) Los pacientes diagnosticados con GBM que expresan el gen p53 presentan mayor tiempo de sobrevida frente a aquellos pacientes con Glioblastoma Multiforme que no expresan este gen.
- 3) Se evidencia que la expresión a nivel moderado del antígeno ki67 y la expresión del gen p53 se pueden determinar como factores pronóstico de la sobrevida de pacientes que hayan sido diagnosticados con Glioblastoma Multiforme.
- 4) Se demostró también que otras variables como la edad o el sexo no son factores determinantes para el diagnóstico del paciente con Glioblastoma Multiforme.

IX. REFERENCIAS CITADAS

1. Castañeda CA, Casavilca S, Orrego E, García-Corrochano P, Deza P, Heinike H, et al. Glioblastoma: análisis molecular y sus implicancias clínicas. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2015; 32(2):316-25.
2. Cohen BH, Zeltzer PM, Boyett JM, Geyer JR, Allen JC, Finlay JL, et al. Prognostic factors and treatment results for supratentorial primitive neuroectodermal tumors in children using radiation and chemotherapy: A Children's Cancer Group randomized trial. *J Clin. Oncol*. 1995; 13:1687-1696.
3. De Angelis LM. Brain tumors. *NEJM*. 2001; 344:114.
4. Dubrow R, Darefsky AS. Demographic variation in incidence of adult glioma by subtype, United States, 1992-2007. *BMC cancer*. 2011; 11: 325. Epub 2011/08/02.
5. Enrique López-Aguilar. Sobrevida de los pacientes con astrocitoma de alto grado que expresan el antígeno Ki67, atendidos en un hospital de pediatría [IsBasedOn] *Gaceta médica de México*, ISSN 0016-3813, Vol. 146, N°. 2, 2010, pags. 118-123.
6. Fisher JL, Schwartzbaum JA, Wrensch M, Wiemels JL. Epidemiology of brain tumors. *Neurologic clinics*. 2007;25(4):867-90, vii. Epub 2007/10/30.
7. Funk JO, Kind P. [Cell cycle control, genetic instability and cancer] *Hautarzt* 1997;48(3):157-65.
8. Gordon-Firing S. Clasificación e histogénesis de los tumores primitivos del sistema nervioso central. In: *Tratamiento de los tumores primitivos del sistema nervioso central: nuestra experiencia desde 1975 a 1993*. Montevideo: Oficina del Libro AEM, 1995. p. 19-29.
9. Grotzer M, Janss A, Georger B, Zhao H, Rorke LB, Phillips PC. Prognostic significance of Ki 67 (M1B1) proliferation index in childhood primitive neuroectodermal tumours of the central nervous system. *Med Pediatr Oncol* 2001; 36:268-273.

10. Gutmann DH, James CD, Poyhonen M, Louis DN, Ferner R, Guha A, et al. Molecular analysis of astrocytomas presenting after age 10 in individuals with NF1. *Neurology* 2003; 61:1397-1400.
11. Heegaard S, Sommer HM, Broholm H, Broendstrup O. Proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 immunohistochemistry of oligodendrogliomas with special reference to prognosis. *Cancer*. 1995;76:1809-1813.
12. Hilton D, Love S, Barber R, Ellison D, Sandeman DR. Accumulation of p53 and Ki-67 expression do not predict survival in patients with fibrillary astrocytomas or the response of these tumours to radiotherapy. *Neurosurgery* 1998; 42:724-729.
13. Idbaih A. Molecular genetic markers as predictors of response to chemotherapy in gliomas. *Current Opinion in Oncology*. 2007; 19:606 - 611.
14. Isolan GR. Astrocytic neoplasms and correlation with mutated p53 and Ki-67 proteins. *Arq Neuropsiquiatr* 2005; 63:997-1004.
15. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al. Cancer statistics, 2008. *CA: A cancer journal for clinicians*. 2008;58 (2):71-96. Epub 2008/02/22.
16. Jha P, Agarwal S. Heterozygosity status of 1p and 19q and its correlation with p53 protein expression and EGFR amplification in patients with astrocytic tumors: novel series from India. *Cancer Genet Cytogenet*. 2010; 198:126-34.
17. Johannessen A, Thorp SH. The Clinical value of Ki-67/MIB-1 labeling index in human astrocytomas. *Pathol Oncol* 2006; 12:143-147.
18. Kleihues P, Cavenee K. World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics. *Tumours of the nervous system*. Lyon: IARC Press, 2000. 314 p.
19. Loew S, Schmidt U, Unterberg A, Halatsch ME. The epidermal growth factor receptor as a therapeutic target in glioblastoma multiforme and other malignant neoplasms. *Anticancer Agents Med Chem*. 2009; 9:703- 715.

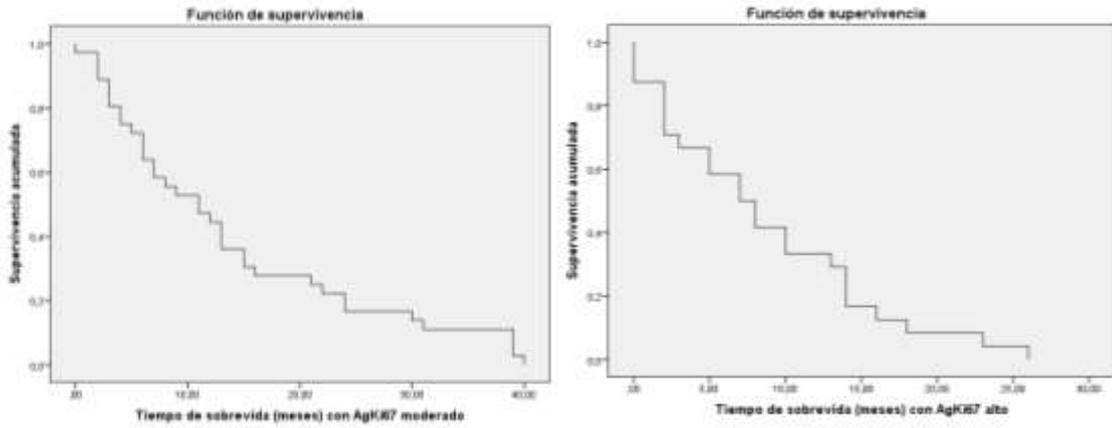
20. López- Aguilar E, Cerecedo- Díaz F, Sepúlveda- Vildósola A, Rivera- Márquez H, Castellano-Toledo A, Arias-Gómez J, et al. Astrocitomas en pediatría. Factores pronósticos. *Gac Med Mex* 1997;133:231-235.
21. López-Muñiz A, Gutiérrez JC, García- Fernández C, Herrero A. Valor Pronóstico de los marcadores tumorales de proliferación celular y angiogénesis en los oligodendrogliomas. *Oncología* 2000; 27:289-296.
22. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta neuropathologica*. 2007;114(2):97-109. Epub 2007/07/10.
23. Montine TJ, Vandersteenhoven JJ, Aguzzi A, Boyko OB, Dodge RK, Kerns BJ, et al. Prognostic significance of Ki-67 proliferation index in supratentorial fibrillary astrocytic neoplasms. *Neurosurgery*. 1994; 34:674- 679.
24. Nejat F, El Khashab M, Rutka J. Initial management of childhood brain tumors: neurosurgical considerations. *J Child Neurol* 2008;23:1136- 1148.
25. Perry A, Anderl K, Borell TJ, Kimmel DW, Wang CH, O'Fallon JR, Feuerstein BG, Scheithauer BW, Jenkins RB. Detection of p16, RB, CDK4, and p53 gene deletion and amplification by fluorescence in situ hybridization in 96 gliomas. *Am J Clin Pathol*. 1999;112: 801-9.
26. Perry ME, Levine AJ. Tumor suppressor p53 and the cell cycle. *Curr Opin Genet Devel* 1993; 3:50.
27. Preston Martin S. Epidemiology. In: Berger M, Wilson CB, eds. *The gliomas*. Philadelphia: WB Saunders, 1999. p.2-11.
28. Registro de Cáncer de Lima Metropolitana. Volumen IV Estudio de incidencia y mortalidad (2004 - 2005). Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. 2014.
29. Ruano Y. Worse outcome in primary glioblastoma multiforme with concurrent epidermal growth factor receptor and p53 alteration. *Am J Clin Pathol*. 2009; 131:257-63.

30. Shiraishi S., Tada K., Nakamura H., Makino K., Kochi M., Saya H., Kuratsu J., Ushio Y. Influence of p53 mutations on prognosis of patients with glioblastoma. *Cancer*. 2002; 95:249–257. [[PubMed](#)].
31. Symonds H, Krall C, Remington L. Dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo. *Cell* 1994; 78:703.
32. Thorp SH. Proliferative activity in human glioblastomas: evaluation of different Ki67 equivalent antibodies. *J Mol Pathol* 1997; 50:198-200.
33. Tihan T, Davis R, Elowitz E, DiCostanzo D, Moll U. Practical value of Ki-67 and P53 labelling indexes in stereotactic biopsies of diffuse and pilocytic astrocytomas. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124:108-113. 23.
34. Ying H, Zheng H, Scott K, et al .Mig-6 controls EGFR trafficking and suppresses gliomagenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010 Apr 13;107(15):6912-6917.

X. ANEXOS

Anexo 1. Base de datos por paciente: Variables y Criterios de medición.

| Variable | Indicador | Criterios de Medición de las Categorías | Escala de Medición |
|---|----------------------|--|--------------------|
| Edad | Fecha de Nacimiento | | Años |
| Sexo | Historia Clínica | F_Femenino/M_Masculino | F/M |
| Diagnostico | Inmunohistoquímica | | GBM |
| Localización | Resonancia Magnética | Derecho_1_Izquierdo_2_Bilateral_3_Pineal_0 | 0-3 |
| Status del paciente al diagnóstico | Historia Clínica | Karnofsky_al_diagnostico/70_1/80_2/90_3/100_4 | 1-4 |
| Convulsiones | Historia Clínica | Convulsión_No_0_Si_1 | 0-1 |
| Resección del tumor | Historia Clínica | Resección Subtotal_1/Resección Total_2/No se reporto_3 | 1-3 |
| Radioterapia/Quimioterapia | Historia Clínica | Si_1/No_2/No se reporto_3 | 1-3 |
| Fecha de Operación | Historia Clínica | | Año/Mes |
| Fecha defunción/ Última consulta | Historia Clínica | | Año/Mes |
| P53 | Inmunohistoquímica | Bajo_1/Moderado_2/Alto_3/No se reporto_4 | 1-4 |
| Ki67 | Inmunohistoquímica | Negativo_1/Positivo_2/No se reporto_3 | 1-3 |



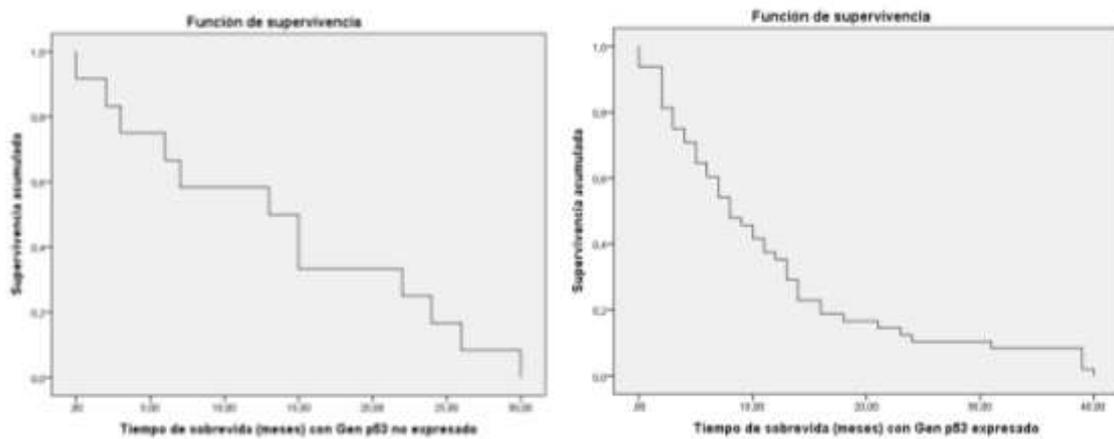
a)

b)

Fig.1

a) Tiempo de supervivencia vs Expresión AgKi67 alto

b) Tiempo de supervivencia vs Expresión AgKi67 moderado



a)

b)

Fig.2

a) Tiempo de supervivencia vs Expresión del Gen P53

b) Tiempo de supervivencia vs No expresión del Gen P53

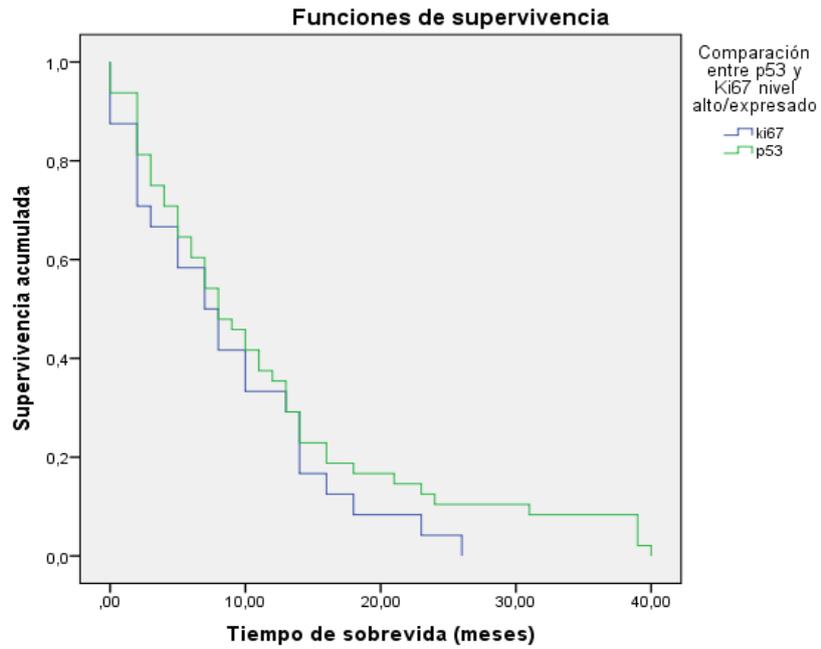


Fig.3

Comparación de los tiempos de supervivencia según la expresión del gen P53 y AgKi67 alto

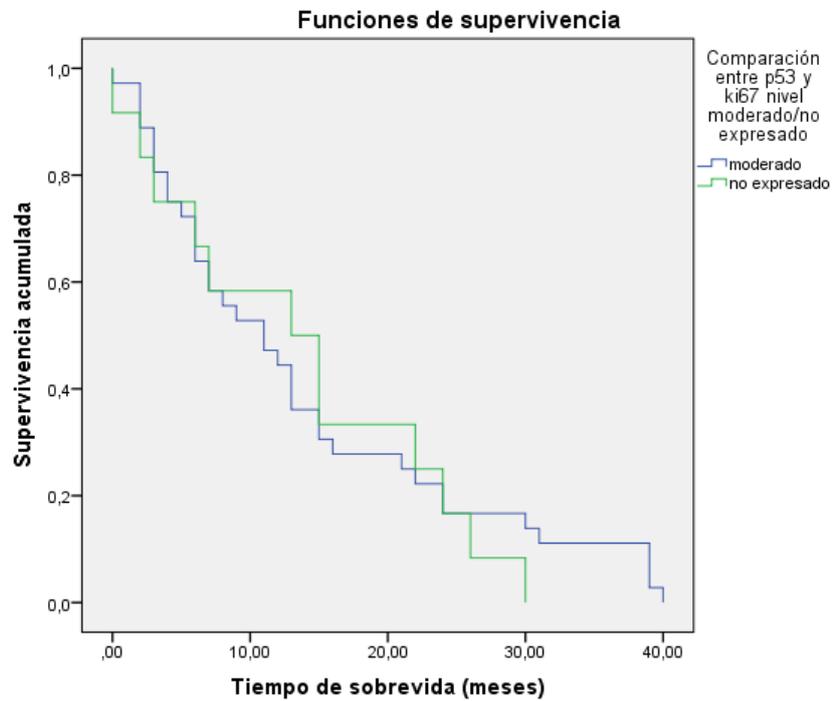


Fig.4

Comparación de los tiempos de supervivencia según la no expresión del gen P53 y AgKi67 moderado

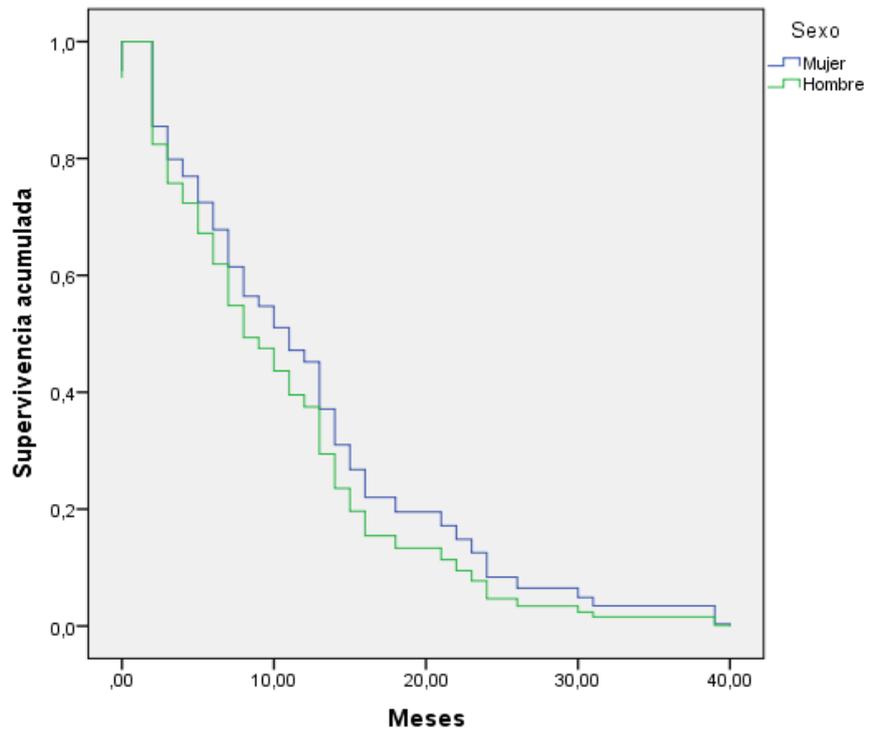


Fig.5

Tiempo de sobrevida según el sexo