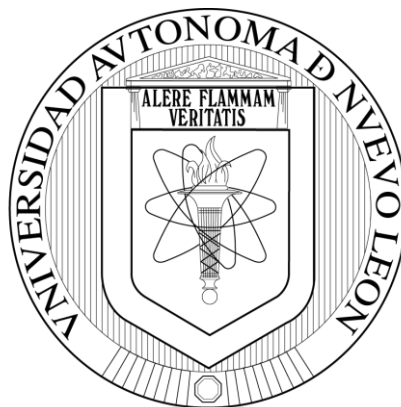


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



PREVALENCIA DEL CMV, ESTADO DE METILACIÓN DEL PROMOTOR DE
TP53 Y SU EXPRESIÓN EN PACIENTES CON GLIOBLASTOMA
MULTIFORME DE UNA UNIDAD MÉDICA DE TERCER NIVEL DEL
NORESTE DE MÉXICO

POR

L.B.G. ALDO SEBASTIÁN FLORES FLORES

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA

2021

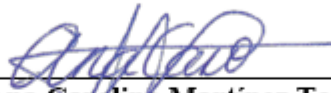
PREVALENCIA DEL CMV, ESTADO DE METILACIÓN DEL PROMOTOR DE
TP53 Y SU EXPRESIÓN EN PACIENTES CON GLIOBLASTOMA
MULTIFORME DE UNA UNIDAD MÉDICA DE TERCER NIVEL DEL
NORESTE DE MÉXICO

COMITÉ DE TESIS



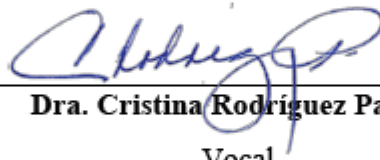
Dr. José Manuel Vázquez Guillén

Presidente



Dra. Ana Carolina Martínez Torres

Secretario



Dra. Cristina Rodríguez Padilla

Vocal



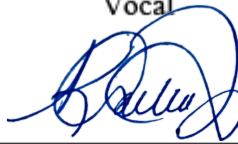
Dra. Vianey González Villasana

Vocal



Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales

Vocal



Dra. Katiushka Arévalo Niño

Subdirectora de Posgrado



SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO

**PREVALENCIA DEL CMV, ESTADO DE METILACIÓN DEL PROMOTOR
DE TP53 Y SU EXPRESIÓN EN PACIENTES CON GLIOBLASTOMA
MULTIFORME DE UNA UNIDAD MÉDICA DE TERCER NIVEL DEL
NORESTE DE MÉXICO**

El presente trabajo de investigación fue desarrollado en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas y la Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Especialidades (UMAE) No. 25 del Instituto Mexicano del Seguro Social, Monterrey, Nuevo León, México bajo la dirección del Dr. José Manuel Vázquez Guillén y del Dr. Gerardo del Carmen Palacios Saucedo.



Dr. José Manuel Vázquez Guillén
Director



Dr. Gerardo C. Palacios Saucedo
Director Externo

DERECHOS RESERVADOS©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

Financiamiento

El presente trabajo fue financiado parcialmente por el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT) de la Secretaría de Investigación y Desarrollo Tecnológico de la UANL.

LUGAR DE TRABAJO

El presente trabajo fue desarrollado en:

- El Laboratorio de Inmunología y Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. bajo la dirección del Dr. José Manuel Vázquez Guillén.
- La Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Especialidades No. 25 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) del I.M.S.S, Monterrey, Nuevo León, México con el Dr. Gerardo C. Palacios Saucedo como Director Externo.
- La Unidad de Genómica del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS) de la Universidad Autónoma de Nuevo León con la asesoría de la Dra. Rocío Ortiz López.
- Medicina Diagnostica S.A. de C.V. Servicios Integrales de Análisis Clínicos, Citopatología, Anatomía Patológica y Oncología Diagnostica. Av. Simón Bolívar 1333, Colonia Mitras Centro, Monterrey, N. L., CP 64460, México con el Dr. Ángel Zavala Pompa como asesor especialista.

El presente trabajo se realizó gracias a las facilidades prestadas por el **Laboratorio de Inmunología y Virología** de la Facultad de Ciencias Biológicas – UANL.



AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Cristina Rodríguez Padilla**, la Academia Inmunología y todo el personal técnico y administrativo del Laboratorio de Inmunología y Virología por las facilidades proporcionadas para la realización de este proyecto.

Al Dr. **José Manuel Vázquez Guillén** por el apoyo que brindado durante el desarrollo del proyecto y por la confianza que tuvo en mí para llevar a cabo este proyecto.

A la **Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales** por su consejos y apoyo en la realización del trabajo de tesis.

Al Dr. **Gerardo C. Palacios Saucedo** de la UMAE No. 25 del IMSS por su invaluable colaboración, por todas sus aportaciones y observaciones en el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. **Ángel Zavala Pompa** por su apoyo en la interpretación de resultados y por prestar sus instalaciones para que pudiera realizar mi proyecto.

A la **Quím. Adriana Gallardo** y la **Quim. Silvia** por su apoyo, sus conocimientos impartidos y la paciencia en su enseñanza.

A la **M.C. Bianka Dianey Camacho Zamora** del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud de la UANL por las facilidades y asesoría brindada durante la realización del proceso de secuenciación para este proyecto.

A la **L.B.G. Alondra Yamileth Alanis Valdez** por todo su apoyo durante el desarrollo experimental de proyecto.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Inmunología y Virología que me brindaron su apoyo para que este proyecto se lograra desarrollar.

DEDICATORIA

A mis padres, Bernardo Flores Delgado y Blanca Nelly Flores Rivas. Por todo el apoyo que me brindaron en los momentos más difíciles de mi formación académica y por las veces que me apoyaron en las decisiones que tome. Les prometo seguir por el camino que ustedes me han inculcado desde pequeño.

Al Dr. José Manuel Vázquez Guillén, por su amistad, apoyo, consejos y enseñanzas desde el primer día que fui parte del laboratorio. Por todas las oportunidades que me ayudo a conseguir y que gracias a su apoyo fue posible cumplir de la mejor manera.

A la Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales, por todo su apoyo y consejos brindados desde que me dio la oportunidad de integrarme a un laboratorio.

A Alondra, por todo el apoyo y consejos que me ha dado durante todo este tiempo, y todos los momentos divertidos que hicieron que estos años no fueran tan difíciles.

A Caro, Eli, Jenny, Roberto, Ilse, Ariadna y Gaby que me han acompañado todo este tiempo, porque siempre me dieron apoyo, consejos cuando más lo necesitaba y me motivaban a ser mejor en lo que hacía

A Melissa, Roberto, Alonso y todos mis compañeros del LIV por todo su apoyo, con ustedes aprendí que durante el trabajo de laboratorio también puede haber diversión, porque las risas hacen que el trabajo sea más sencillo y que no se vuelva algo aburrido.

Índice

ÍNDICE DE TABLAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	iv
RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1 Tumores del sistema nervioso central	2
2.2 Glioma y su clasificación	2
2.3 Epidemiología de los glioblastomas	3
2.4 Etiología de Glioblastoma Multiforme.....	3
2.4.1 Citomegalovirus como oncomodulador	4
2.5 Citomegalovirus y su relación con el glioblastoma.....	6
2.6 Proteína de supresión tumoral p53	7
2.7 Citomegalovirus y su interacción con p53	8
2.8 Metilaciones en glioblastomas	10
2.7.1 Metilaciones en el promotor del gen TP53	11
3 JUSTIFICACIÓN	13
4 HIPÓTESIS.....	14
5 OBJETIVO DEL TRABAJO.....	15
5.1 Objetivo general	15
5.2 Objetivos específicos.....	15
5.2.1 Identificar retrospectivamente tumores del SNC con diagnóstico histopatológico de GBM del Departamento de Anatomía Patológica de la Unidad Médica de Alta Especialidad No. 25 del Instituto Mexicano del Seguro Social y conjuntar la información clínica y de sobrevida de los pacientes.	15
5.2.2 Evaluar la frecuencia de la infección por CMV en tumores del SNC con diagnóstico histopatológico de GBM.	15
5.2.3 Evaluar la expresión de la proteína de supresión tumoral p53 en tumores del SNC con diagnóstico histopatológico de GBM.	15
5.2.4 Identificar el estado de metilación del promotor del gen TP53 en tumores del SNC con diagnóstico histopatológico de GBM.	15
5.2.5 Correlacionar el estado de metilación del promotor del gen TP53 y la expresión de p53 con la sobrevida a 12 meses de los pacientes con tumores del SNC y el estado clínico-histopatológico del GBM.	15
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	16
6.1 Diseño y población en Estudio	16
6.2 Extracción de ADN	16
6.3 Detección de Citomegalovirus por qPCR.....	17
6.4 Evaluación de la expresión de p53 mediante inmunohistoquímica.....	17
6.5 Evaluación de metilaciones en el promotor de TP53	19
6.6 Análisis estadístico	21
7. RESULTADOS.....	22
7.1 Población de estudio.....	22
7.2 Detección de CMV en pacientes con GBM.....	24
7.3 Evaluación de la expresión de p53 en pacientes con GBM.....	24
7.4 Evaluación de la expresión de p53 con respecto a las características clínico-histopatológicas de los pacientes.	29
7.5 Evaluación del estado de metilación del promotor del gen TP53 en pacientes con GBM	33
7.6 Evaluación del estado de metilación del promotor del gen TP53 con respecto a las características clínico-histopatológicas de los pacientes.....	35
7 DISCUSION	38
8 CONCLUSION.....	44
9 PERSPECTIVAS	45
10 BIBLIOGRAFÍA	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de un fragmento de 72 pb del gen gB del CMV.....	17
2	Programa de transformación indicado por el fabricante.....	19
3	Características de los cebadores dirigidos al promotor del gen TP53.....	20
4	Composición de la mezcla de PCR utilizando TaKaRa EpiTaq™ HS.....	20
5	Programa de PCR para el termociclador.....	21
6	Características clínicas de 61 pacientes con GBM.....	23
7	Evaluación de la expresión de p53 con respecto a las características clínico-histopatológicas en 61 pacientes con GBM.....	30
8	Evaluación de la expresión positiva de p53 con respecto a las características clínico-histopatológicas en los 40 pacientes con GBM con expresión positiva.....	32
9	Evaluación del estado de metilación del promotor del gen TP53 con respecto a las características clínico-histopatológicas en los 40 pacientes con GBM con expresión positiva.....	36
10	Estado de metilación de 38 pacientes con GBM y su relación con la expresión de p53.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1 Clasificación de los gliomas	3
2 Estructura del virión de Citomegalovirus	5
3 Vías prooncogénicas moleculares activadas por productos HCMV	6
4 Funciones de p53.....	7
5 Esquema de los dominios de la proteína p53 y las mutaciones más comunes en el dominio de unión al AND.....	8
6 Expresión relativa de p53 en glioblastoma y muestras control	9
7 Principales efectos del CMVH sobre los reguladores del ciclo celular tumoral y / o apoptosis.....	10
8 La metilación del promotor de MGMT inhibe la transcripción de MGMT que conduce al silenciamiento de MGMT.....	11
9 Secuencia del bloque sintético de ADN diseñado para emplearse como control positivo de amplificación del CMV. Se resalto el amplicón del gen gB del CMV.....	17
10 Características clásicas de un Glioblastoma multiforme. A) Necrosis en empalizada. B) Hiperplasia endotelial.....	22
11 Curva de amplificación del gen gB del CMV en los casos de GBM. Las líneas rojas corresponden al control positivo (Bloque de ADN genómico) y las líneas verdes corresponden a las muestras de GBM.....	24
12 Tinción IHQ para p53 en GBM del paciente No. 18. A) Tinción del tumor con hematoxilina y eosina. B) Expresión de p53 por IHQ en carcinoma de mama. C) Expresión nuclear de p53 (Expresión negativa) por IHQ en GBM.....	25
13 Tinción IHQ para p53 en GBM del paciente No. 17. A) Tinción del tumor con hematoxilina y eosina. B) Expresión de p53 por IHQ en carcinoma de mama. C) Expresión nuclear de p53 (Expresión baja) por IHQ en GBM.....	26
14 Tinción IHQ para p53 en GBM del paciente No. 13. A) Tinción del tumor con hematoxilina y eosina. B) Expresión de p53 por IHQ en carcinoma de mama. C) Expresión nuclear de p53 (Expresión moderada) por IHQ en GBM.....	27
15 Tinción IHQ para p53 en GBM del paciente No. 19. A) Tinción del tumor con hematoxilina y eosina. B) Expresión de p53 por IHQ en carcinoma de mama. C) Expresión nuclear de p53 (Expresión alta) por IHQ en GBM.....	28
16 Análisis de Kaplan-Meier de la sobrevida a 12 meses de los pacientes con GBM en función de la expresión de la proteína p53.....	31

17	Análisis de Kaplan-Meier de la sobrevida a 12 meses de los pacientes con GBM en función de la expresión positiva de la proteína p53.....	33
18	Electroforesis en gel de agarosa al 2.5%.....	34
19	Electroforesis en gel de agarosa al 2.5%.....	35
20	Análisis de Kaplan-Meier de la sobrevida a 12 meses de los pacientes con GBM en función del estado de metilación del promotor del gen TP53 p53.....	37

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

SNC	Sistema nervioso central
GBM	Glioblastoma multiforme
HCMV	Citomegalovirus humano
TCGA	The Cancer Genome Atlas Program
IE1	Gen intermedio tardío 1
IE2	Gen intermedio tardío 2
IARC	Por sus siglas en inglés, Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer
FFyEP	Fijados en formalina y embebidos en parafina
ADNh	Ácido desoxirribonucleico humano
ng	Nanogramos
μL	Microlitros
μM	Micro molar
min	Minutos
seg	Segundos
A260	Absorbancia 260
A280	Absorbancia 280
A230	Absorbancia 230
gB	Glicoproteína B
TMZ	Temozolamida
qPCR	PCR tiempo real
RT-qPCR	PCR cuantitativa de transcripción inversa
MSP	PCR específica de metilaciones
UM	No metilado
M	Metilado
HCD	Hemisferio central derecho
HCI	Hemisferio central izquierdo
LM	Lóbulo medio
pb	Pares de bases
IHQ	Inmunohistoquímica
HyE	Hematoxilina y Eosina
°C	Grados Celcius
p53	Proteína de supresión tumoral p53

RESUMEN

El glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor del sistema nervioso central más frecuente representando más de 50% de estos, además de tener un pronóstico de supervivencia muy bajo, siendo de 12 a 15 meses después de ser diagnosticados. A pesar de ser tumor más común en el SNC, aún se desconoce su etiología, debido a la falta de información, se han realizado estudios donde relacionan la infección por citomegalovirus y el origen del GBM, sin embargo, la prevalencia encontrada va desde 0 hasta 100%, por esta razón existe una gran controversia sobre si el CMV está relacionado con la etiología de los GBM. En los GBM la proteína de supresión tumoral p53 se encuentra sobreexpresada, sin embargo, son pocos los estudios en donde evalúen si las metilaciones pueden tener un efecto en la expresión de dicha proteína. En este estudio se busca evaluar la prevalencia de la infección por CMV, y si las metilaciones del promotor del gen TP53 pueden tener un efecto en la expresión de p53 y si se relaciona con la sobrevida a 12 meses de todas las muestras de GBM obtenidas y procesadas en el periodo de 1 de enero de 2016 hasta 31 de diciembre de 2019 mediante un muestreo no probabilístico por conveniencia Departamento de Neurocirugía y Departamento de Anatomía Patológica de la Unidad Médica de Alta Especialidad No. 25 del Instituto Mexicano del Seguro Social. A partir de los 61 casos confirmados como GBM se encontró un 0% de prevalencia de infección por CMV, de los 61 casos iniciales se evaluó la expresión de 57 especímenes, donde se encontraron 17 con expresión negativa (<10% de núcleos teñidos) y 40 con expresión positiva ($\geq 10\%$ de núcleos teñidos), en el análisis de Kaplan-Meier de la expresión de p53 se observó una disminución en la sobrevida de los pacientes con expresión negativa ($p=0.093$). Se encontraron 18 (45%) casos con expresión baja (10-25% de núcleos teñidos), 11 (27.5%) con expresión moderada (26-50% de núcleos teñidos) y 11 (27.5%) con expresión alta ($>50\%$ de núcleos teñidos), se encontró una diferencia significativa en la resección quirúrgica ($p=0.021$) y el tratamiento ($p=0.037$). Se determinó el estado de metilaciones del promotor del gen TP53 de 41 casos, encontrando 21 (51.2%) metilados y 20 (48.8%), se encontró una diferencia significativa en la edad ($p=0.05$) y en los casos que fueron mayores a ≥ 65 años (0.039). La correlación entre la expresión de p53 y el estado de metilaciones del promotor del gen TP53 no fue significativa ($p=1.000$), esto quiere decir que la metilación no afecta a la expresión de p53.

ABSTRACT

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common central nervous system tumor, representing more than 50% of these, in addition to having a very low survival prognosis, being 12 to 15 months after being diagnosed. Despite being the most common tumor in the CNS, its etiology is still unknown, due to the lack of information, studies have been carried out where cytomegalovirus infection and the origin of GBM are related, however, the prevalence found ranges from 0 to 100%, for this reason there is a great controversy about whether CMV is related to the etiology of GBM. In GBM, the p53 tumor suppression protein is overexpressed; however, few studies evaluate whether methylations can have an effect on the expression of said protein. This study seeks to evaluate the prevalence of CMV infection, and whether the methylations of the promoter of the TP53 gene may have an effect on the expression of p53 and whether it is related to the 12-month survival of all GBM samples obtained and processed in the period from January 1, 2016 to December 31, 2019 through a non-probability sampling for convenience Department of Neurosurgery and Department of Pathological Anatomy of the High Specialty Medical Unit No. 25 of the Mexican Institute of Social Security. From the 61 cases confirmed as GBM, a 0% prevalence of CMV infection was found, of the 61 initial cases the expression of 57 specimens was evaluated, where 17 were found with negative expression (<10% of stained nuclei) and 40 with positive expression ($\geq 10\%$ of nuclei stained), in the Kaplan-Meier analysis of p53 expression, a decrease in survival was observed in patients with negative expression ($p = 0.093$). There were 18 (45%) cases with low expression (10-25% of stained nuclei), 11 (27.5%) with moderate expression (26-50% of stained nuclei) and 11 (27.5%) with high expression ($> 50\%$ nuclei stained), a significant difference was found in surgical resection ($p = 0.021$) and treatment ($p = 0.037$). The methylation status of the TP53 gene promoter was determined in 41 cases, finding 21 (51.2%) methylated and 20 (48.8%), a significant difference was found in age ($p = 0.05$) and in cases that were older than ≥ 65 years (0.039). The correlation between the expression of p53 and the methylation status of the promoter of the TP53 gene was not significant ($p = 1,000$), this means that the methylation does not affect the expression of p53.

1. INTRODUCCIÓN

Los tumores del sistema nervioso central (SNC) representan el 2% de todas las neoplasias y tienen una incidencia mayor en hombres que en mujeres (Chen et al., 2013). Los gliomas son los tumores más comunes del SNC, y dentro su clasificación se encuentran los gliomas de alto grado, mejor conocidos como glioblastomas multiformes (GBM), estos representan más del 50% de los tumores del SNC y son los más agresivos con un pronóstico de supervivencia muy pobre, siendo apenas de 12 a 15 meses una vez realizado el diagnóstico.

La etiología de los GBM aún es desconocida, algunos reportes indican que la exposición a radiación ionizante y los tratamientos a pacientes con leucemia linfocítica son factores de riesgo para el desarrollo de este tumor (Hanif et al., 2017). Algunos autores relacionan la infección por virus oncomoduladores con la aparición o progresión del GBM, uno de los virus estudiados es el Citomegalovirus (CMV), sin embargo, los resultados son controversiales debido a que la prevalencia reportada va desde 0 hasta 100% (Rahman et al., 2019). El CMV puede interactuar con las vías del ciclo celular alterando su expresión, un ejemplo de esto son las proteínas IE1 e IE2 que disminuyen la expresión de la proteína de supresión tumoral p53 (Afshar et al., 2016).

El gen TP53 se encuentra mutado en más del 70% de los tipos de cáncer, según el TCGA los GBM presentan mutaciones en el en 30% de los casos, aunque estos valores varían dependiendo del tipo de GBM. Estas mutaciones van a causar una sobreexpresión de la p53 y lo conlleva a tener una ganancia de función (GOF-mutp53) en eventos como la promoción de la proliferación celular, la metástasis, la inestabilidad genómica, la reprogramación metabólica, y la resistencia a la terapia en el cáncer (Ludwig & Kornblum, 2017; Zhang et al., 2018). Existen pocos reportes si los eventos epigenéticos; como las metilaciones en el promotor del gen TP53, estén relacionados con la expresión de la proteína p53, y aún más importante, si esta variación en la expresión está relacionada con la sobrevida de los pacientes (Jesionek-Kupnicka et al., 2014).

2. ANTECEDENTES

2.1 Tumores del sistema nervioso central

Los tumores del sistema nervioso central (SNC) se clasifican como tumores de tejido neuroepitelial, tumores de las meninges, tumores de la región sellar, tumores de células germinales, tumores de cráneo y nervios paraespinales, linfomas y neoplasias hematopoyéticas, tumores metastásicos, siendo los más comunes los tumores de las meninges y neuroepiteliales (Anaya-Delgadillo et al., 2016). Los SNC son menos frecuentes a comparación de los tumores presentes en otros sitios, como sistema respiratorio o digestivo, pero, la frecuencia comenzó a aumentar con el tiempo. En 2012, la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) reportó que la incidencia era de 7.7 por cada 100,000 hombres y 6 por cada 100,000 mujeres (Chen et al., 2013).

2.2 Glioma y su clasificación

Los gliomas son un tumor del sistema nervioso central que representa alrededor del 80% de estos (Schwartzbaum et al., 2006). Se han clasificado como tumores astrocíticos, oligodendrogiales y ependimarios, además de que se les asignan grados (del I al IV) para indicar los grados de malignidad (Louis et al., 2001). El glioma de grado IV también conocido como glioblastoma (**Figura 1**) es el más agresivo de los tumores del SNC y los pacientes diagnosticados tienen un pronóstico de supervivencia bajo. La organización mundial de la salud ha indicado que para la clasificación de los gliomas también se deben evaluar algunas alteraciones genéticas, como es el caso específico de los glioblastomas (Tumor de origen astrocítico), en estos tumores no basta con la clasificación histológica, debido a que existen 2 tipos de glioblastomas multiformes, cuando el tumor se presenta directamente como GBM es conocido como Glioblastoma Multiforme primario (*de novo*), en cambio cuando el tumor progresa de un glioma de bajo grado a un GBM es conocido como un GBM secundario, la forma de diferenciarlos es analizando el estado mutacional del gen IDH. Las mutaciones en IDH132 indicaría que él es un GBM secundario, mientras que los GBM primarios presentan IDH nativo Louis et al., 2016.

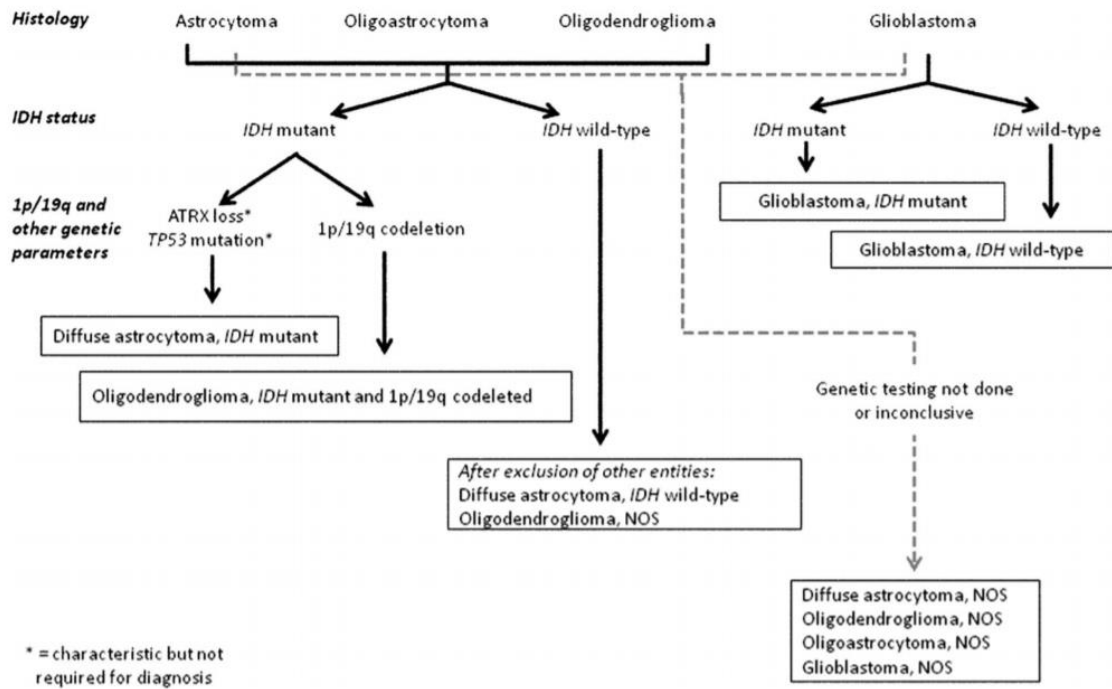


Figura 1. Clasificación de los gliomas. Obtenido de Louis et al., 2016

2.3 Epidemiología de los glioblastomas

Los glioblastomas tienen una incidencia de 3.19 por cada 100,000 personas en EUA y representa casi el 60% de todos los tumores del SNC, además, la incidencia es 1,6 veces mayor en los hombres en comparación con las mujeres y 2,0 veces mayor en los caucásicos en comparación con los africanos y afroamericanos, con menor incidencia en los asiáticos y los indios americanos (Tamimi et al., 2017). Los pacientes diagnosticados con glioblastoma tienen un pronóstico muy pobre teniendo aproximadamente 12 meses de supervivencia después del diagnóstico, sin embargo, del 3 al 5% de los pacientes diagnosticados sobreviven más de 3 años (Krex et al., 2007). Además, se ha demostrado que los glioblastomas pueden ser primarios (también conocidos como glioblastomas *de novo*) y secundarios, siendo los ultimo la evolución de un glioma de bajo grado a un glioblastoma (grado IV) (Hanif et al., 2017; Rodríguez et al., 2012).

2.4 Etiología de Glioblastoma Multiforme

La etiología de las neoplasias cerebrales como el glioblastoma son poco conocidas, aun no se han podido identificar causas carcinogénicas, hasta el día de hoy el único factor de riesgo confirmado es la exposición a altas dosis de radiación

ionizante, esto debido a que desde 1960 se informaron más de 116 casos de glioblastoma como resultado de la exposición a la radiación, y se logró estimar que el riesgo a desarrollar glioblastoma después de la radioterapia es del 2.5%. Lo anterior también se puede confirmar con un estudio donde analizaron los efectos de la radiación producida por la bomba atómica en Nagasaki e Hiroshima, en donde encontraron que la incidencia de los tumores cerebrales (incluido los gliomas). Otros datos indican que algunos pacientes que fueron sometidos al tratamiento para la leucemia linfocítica aguda fueron más propensos a desarrollar glioblastoma, aunque aún no se comprueba si esto es debido a complicaciones derivadas a la leucemia o el uso de agentes quimioterapéuticos. Hasta el momento no se ha logrado encontrar relación entre el desarrollo de glioblastoma y los factores ambientales como tabaquismo, factores de riesgo de la dieta, el uso de teléfonos celulares, lesiones en la cabeza o a la exposición a pesticidas (Hanif et al., 2017).

2.4.1 Citomegalovirus como oncomodulador

El betaherpesivirus 5, también conocido como citomegalovirus humano (CMVH), es un miembro de la subfamilia de *Betaherpesvirinae* de *Herpesviridae*. Es un virus de ADN de doble cadena que contiene aproximadamente 200 genes, además de microARN y ARN no codificantes. La mayoría de la población mundial en la edad adulta se encuentra infectada por el CMVH, siendo de entre el 50 al 80% de los adultos de 40 años (Landolfo et al., 2003; Rahman et al., 2019).

Se ha descrito que el CMVH puede mantener la infección latente durante toda la vida, puede infectar un bajo porcentaje de células progenitoras hematopoyéticas, se pueden encontrar de 2 a 13 copias del genoma del virus (en forma de plásmido extracromosómico) en cada células infectada (Slobedman et al., 2004). Se maneja el término de “infección por CMVH” para indicar una infección latente, y “enfermedad por CMVH” cuando el paciente presenta síntomas (Wang et al., 2011). Las personas inmunocompetentes, pueden generar una respuesta inmune fuerte y generalmente no desarrollan síntomas de infección, en cambio, personas con sistema inmune débil puede ser causa de morbilidad y mortalidad. Los síntomas que presentan las personas infectadas con CMVH son fiebre aguda, leucopenia, malestar general, hepatitis, neumonía, enfermedad gastrointestinal y retinitis. Es importante mencionar que el CMVH se ha relacionado con enfermedades inflamatorias y proliferativas como enfermedades cardiovasculares y cáncer (Tomtishen, 2012).

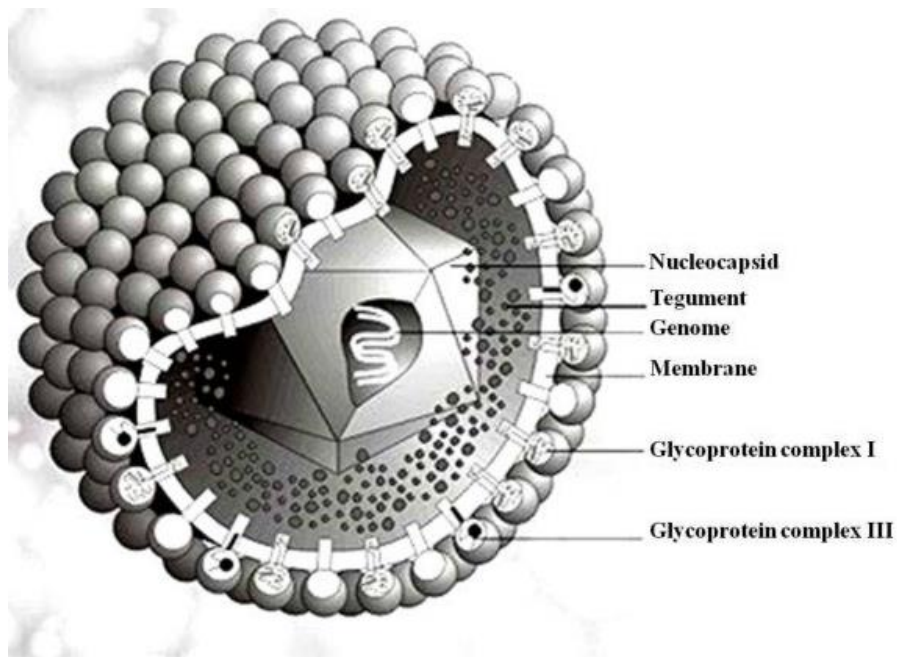


Figura 2. Estructura del virión de Citomegalovirus. Obtenida de Tomtishen, 2012.

Se ha definido al CMVH como un virus oncomodulador que puede tener un impacto sobre el aumento de la malignidad después de una infección viral, sin embargo, esta definición aun se encuentra en discusión debido a que se debe comprobar que la infección por HCMV de células ya transformadas favorece el desarrollo de la oncogénesis y/o activa las vías implicadas en la transformación y/o la oncogénesis (**Figura 3**). En diversos estudios en diversos tejidos cancerosos como los gliomas se han detectado proteínas virales, así como ADN, sin embargo, no en todos los tejidos tumorales se ha logrado detectar el CMV, esto puede deberse a la técnica utilizada para la detección, sin embargo, los resultados negativos pueden deberse a que las células tumorales solo contienen una parte del genoma del virus (Herbein, 2018).

positivas a la infección por CMVH, la gran variación en el porcentaje de prevalencia de la infección de CMVH en el tejido tumoral puede deberse a la especificidad y sensibilidad de las distintas técnica utilizada (Rahman et al., 2019).

2.6 Proteína de supresión tumoral p53

Algunas señales de estrés como daño de ADN, activación de oncogenes y privación de nutrientes que inducen la expresión de p53, además la detención del ciclo celular y la apoptosis son los resultados de la activación de p53 (**Figura 4**). Existen una gran cantidad de artículos que muestran que el ciclo celular p53 y funciones de apoptosis son importantes para la prevención del desarrollo tumoral, además de regular procesos celulares como el metabolismo, respuesta antioxidante y reparación de ADN (Shaw, 1996).

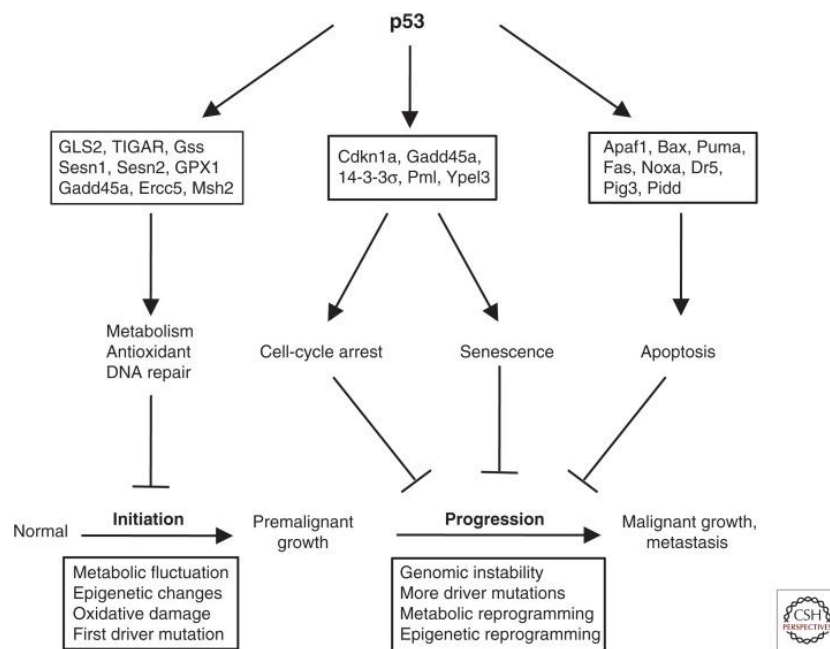


Figura 4. Funciones de p53

Desde el descubrimiento de la proteína p53 se han realizado muchos estudios para determinar su papel en la supresión de tumores, se ha determinado que el inicio o progresión tumoral de una gran cantidad de cánceres humanos se debe a la pérdida de la función de p53 por mutaciones o la sobreexpresión de sus reguladores como los son MDM2, MDM4 y PPM1D, sin embargo, además de encontrarse con la pérdida de la función de p53 mutado, también se pueden encontrar mutaciones denominadas GOF (Gain of function, por sus siglas en inglés) en los codones R175, R245, R248, R249, R273 y R282 del dominio de unión al ADN (**Figura 5**). Ahora se conoce que p53 GOF

tiene actividades en la promoción de la proliferación celular, la metástasis, la inestabilidad genómica, la reprogramación metabólica, el tallo celular, la remodelación del microambiente tumoral, la inmunosupresión y la resistencia a la terapia en el cáncer (Zhang et al., 2018; Zhang et al., 2020).

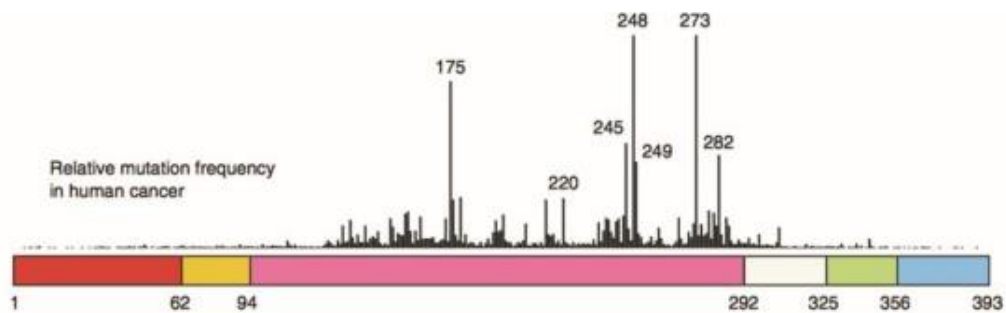


Figura 5. Esquema de los dominios de la proteína p53 y las mutaciones más comunes en el dominio de unión al ADN. Obtenida de Zhang et al., 2018

En algunos tipos de cáncer como carcinomas colorrectales, pulmonares, de próstata y de mama se ha encontrado que la sobreexpresión de p53 tiene un valor pronostico (Dobes et al., 2014; Robles & Harris, 2010; Schlomm et al., 2008), además se ha encontrado una relación entre la mutación GOF de TP53 y la sobreexpresión de p53, esto debido a que p53 nativa es una proteína inestable que tiene una vida media corta para ser evaluada por medio inmunohistoquímica a diferencia de p53 GOF que se acumula dentro de la célula tumoral. Por esta razón, por medio de inmunohistoquímica se puede sugerir posibles mutaciones, aunque la secuenciación sea la técnica más adecuada para determinar mutaciones en p53 (Murnyák & Hortobágyi, 2016).

Se han realizado estudios en donde se determina la correlación de la expresión de la proteína p53 y la sobrevida de los pacientes con glioblastoma en donde se encontró una mediana de supervivencia de 19.3 y 26.2 meses para pacientes con p53 mutante y p53 nativa, respectivamente. Se encontró que los pacientes con p53 nativa tenían una mayor sobrevida que los pacientes con p53 mutante (Chaurasia et al., 2016).

2.7 Citomegalovirus y su interacción con p53

Se ha estudiado la relación la expresión de p53 en glioblastomas contra la ausencia o presencia de citomegalovirus, encontraron que en las muestras que eran negativas para CMV tenían una expresión reducida a comparación con los controles, y para las muestras que eran positivas la expresión de p53 era aún menor. La presencia

de HCMV en muestras de glioblastoma podría considerarse para un peor pronóstico del paciente, esto debido a la baja expresión de p53 (Afshar et al., 2016).

En un estudio realizado en 199 pacientes con glioblastoma se determinó que 20 casos (10%) eran positivos al material genético de CMV y 179 (90%) resultaron positivos, además se cuantificó la expresión relativa de p53 en los grupo control, negativos a HCMV y positivos a CMV (**Figura 6**), encontraron una expresión disminuida en los pacientes con GBM y negativos para CMV a comparación del grupo control, y más importante fue la drástica disminución de la expresión de p53 en el grupo de pacientes con GBM y positivos para CMV (Afshar et al., 2016).

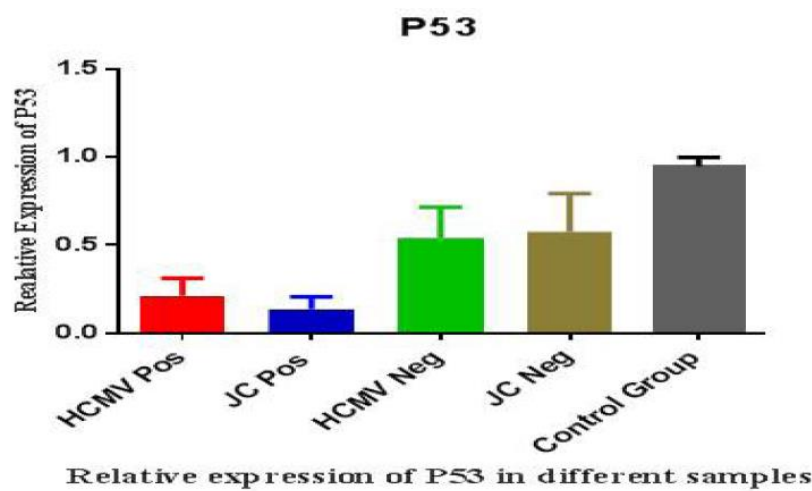


Figura 6. Expresión relativa de p53 en glioblastoma y muestras control. Obtenida de Afshar et al., 2016

En células las células tumorales, la función de las proteínas reguladoras del virus puede depender del contexto interno de las células tumorales. Algunos autores sugieren que el CMVH tiene un efecto antiapoptótico sobre las células mediante la proteína IE del virus, y estos mecanismos pueden ser independientes y dependientes de p53 (**Figura 7**). Se ha descrito que la proteína IE2-86 se une a p53 lo que provoca una inhibición de la función transactivadora y protege de la apoptosis mediada por p53 (Michaelis et al., 2009).

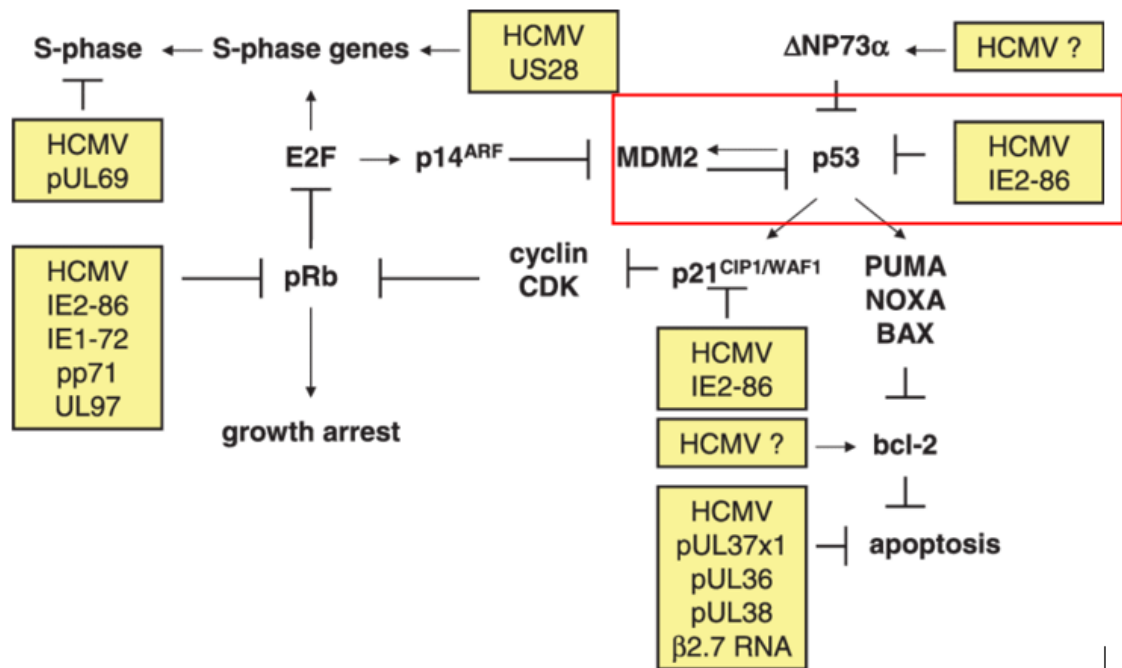


Figura 7. Principales efectos del CMVH sobre los reguladores del ciclo celular tumoral y / o apoptosis. Obtenida de Michaelis et al., 2009.

2.8 Metilaciones en glioblastomas

Los glioblastomas se caracterizan por una heterogeneidad genética y transcripcional generalizada, aunque la información sobre la epigenética sobre la progresión tumoral aun es escasa (Klughammer et al., 2018). Uno de los genes mejor estudiados en cuanto a metilaciones en el promotor es la O⁶-metilguanina-ADN metiltransferasa (MGMT), siendo un indicador pronóstico en los pacientes, la inactivación transcripcional debido a la metilación del promotor de MGMT (**Figura 8**) se ha correlacionado con una mejor respuesta a quimioterapias con temozolamida (TMZ) lo que conlleva a una supervivencia global mayor en los pacientes con GBM (Abe et al., 2018). En pacientes con hipometilaciones en el promotor de MGMT presentan resistencia al tratamiento con TMZ debido a que MGMT elimina los grupos alquilo de la guanina en el ADN, contrarrestando la eficacia de las quimioterapéuticos alquilantes en células tumorales (Feldheim et al., 2019).

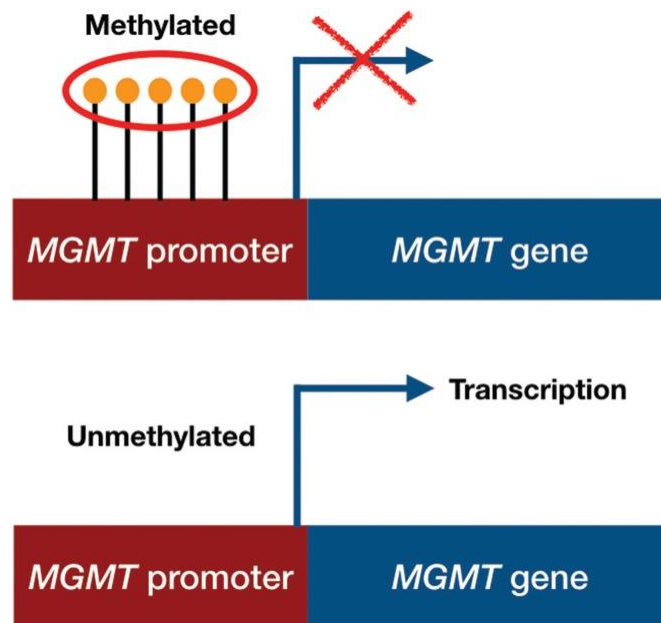


Figura 8. La metilación del promotor de MGMT inhibe la transcripción de MGMT que conduce al silenciamiento de MGMT. Obtenido de Abe et al., 2018.

2.7.1 Metilaciones en el promotor del gen TP53

La hipermetilación en los promotores de genes supresores de tumores se ha relacionado con el silenciamiento transcripcional que conlleva a la progresión tumoral. A pesar de que TP53 no contenga islas CpG; en donde comúnmente se presentan las metilaciones, contiene 15 dinucleótidos CpG en la región con actividad promotora, que incluye 85 pb del exón 1 no codificante, estudios *in vitro* indicaron que las metilaciones en esta región conducirían a una expresión disminuida de p53, sin embargo, también mencionaron que faltaban estudios en cánceres humanos (Agirre et al., 2003). Sidhu y colaboradores en 2005 analizaron las metilaciones en el promotor del gen TP53 en 10 muestras cánceres adrenocorticales esporádicos (ACC) y llegaron a la conclusión de que la hipermetilación en TP53 no jugaba un papel importante en el silenciamiento transcripcional de la proteína de supresión tumoral p53 (Sidhu et al., 2005).

Amatya y colaboradores en 2005 evaluaron la interrupción de la vía p53/p14 en gliomas de bajo grado, para esto detectaron metilación en los promotores de TP53 y p14 encontrando que estaban presentes en 29/48 (60%) astrocitomas de bajo grado, 11/18 (61%) oligoastrocitomas y 31/42 (74%) oligodendrogliomas, y 5/49 (10%) astrocitomas de bajo grado, 7/18 (39%) oligoastrocitomas y 15/41 (37%) oligodendrogliomas, respectivamente. Ellos concluyeron que las metilaciones en TP53

y p14; además de mutaciones en TP53, pueden estar relacionadas con la interrupción de la vía (Amatya et al., 2005).

Posterior a los reportes de estudios *in vitro* y los realizados en gliomas de bajo grado Jesionek-Kupnicka y colaboradores en 2014 evaluaron las metilaciones, niveles de expresión y mutaciones en TP53, así como la expresión de p53 en 42 muestras de GBM, ellos indicaron no encontraron una relación entre las metilaciones en el promotor de TP53 y los niveles del ARNm de TP53, y tampoco entre las metilaciones del promotor de TP53 y la expresión de la proteína TP53. Sin embargo, mencionan sus datos solo sugieren que la metilación en el promotor del gen TP53 no juega un papel en el silenciamiento de TP53 expresión transcripcional y proteica, estos datos deberían confirmarse debido al tamaño del grupo de estudio (Jesionek-Kupnicka et al., 2014).

3 JUSTIFICACIÓN

El glioblastoma multiforme es el tumor primario más frecuente en adultos, y una vez diagnosticado la sobrevida es de aproximadamente 12 meses. La infección por Citomegalovirus se ha relacionado con el origen de glioblastoma, pero, sigue en controversia debido a que diversos estudios han reportado una prevalencia de 0 hasta un 100%. Se ha reportado que la expresión de p53 en muestras positivas para CMV eran menores que en las muestras en las que no se encontró CMV. Además, se ha determinado que las mutaciones en el gen TP53 pueden provocar una ganancia de función de p53 y esto es evidente en la expresión nuclear acumulada de p53 en los pacientes con GBM, sin embargo, aún no se aclara el rol de las metilaciones del promotor del gen TP53 en GBM relacionado con la expresión y la sobrevida de los pacientes.

4 HIPÓTESIS

La metilación del promotor del gen TP53 y la presencia de CMV se correlaciona con la expresión de p53 y ésta se asocia con una peor supervivencia a 12 meses en los pacientes con GBM.

5 OBJETIVO DEL TRABAJO

5.1 Objetivo general

Evaluar la frecuencia de infección por CMV y el perfil de metilación del promotor del gen TP53 y su expresión en tumores de pacientes con diagnóstico histopatológico de GBM.

5.2 Objetivos específicos

- 5.2.1** Identificar retrospectivamente tumores del SNC con diagnóstico histopatológico de GBM del Departamento de Anatomía Patológica de la Unidad Médica de Alta Especialidad No. 25 del Instituto Mexicano del Seguro Social y conjuntar la información clínica y de sobrevida de los pacientes.
- 5.2.2** Evaluar la frecuencia de la infección por CMV en tumores del SNC con diagnóstico histopatológico de GBM.
- 5.2.3** Evaluar la expresión de la proteína de supresión tumoral p53 en tumores del SNC con diagnóstico histopatológico de GBM.
- 5.2.4** Identificar el estado de metilación del promotor del gen TP53 en tumores del SNC con diagnóstico histopatológico de GBM.
- 5.2.5** Correlacionar el estado de metilación del promotor del gen TP53 y la expresión de p53 con la sobrevida a 12 meses de los pacientes con tumores del SNC y el estado clínico-histopatológico del GBM.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Diseño y población en Estudio

A través de un estudio transversal, observacional, descriptivo y retrospectivo con autorización por las comisiones de Ética e Investigación del Comité Nacional de Investigación Científica del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) se incluyeron especímenes fijados en formalina y embebidos en parafina (FFyEP) de biopsias cerebrales realizadas a pacientes con diagnóstico de GBM por el Departamento de Neurocirugía y almacenadas en el banco de tumores del Departamento de Anatomía Patológica de la Unidad Médica de Alta Especialidad No. 25 (UMAE 25) del IMSS en Monterrey N.L. Todas las muestras correspondieron al período comprendido entre el 1° de enero del 2016 y 31 de diciembre del 2019. El consentimiento informado no fue solicitado debido a que se emplearon especímenes del banco de tumores. Los datos clínico-epidemiológicos de los pacientes se recabaron por indagatoria en sus expedientes médicos, garantizando la confidencialidad y el resguardo apropiado de toda la información obtenida. Cada espécimen fue re-evaluado mediante tinciones histológicas de hematoxilina y eosina (H&E) por el médico patólogo para descartar aquellas que no cumplieran con las características que definen a un GBM, así como las que presentaran tejido tumoral insuficiente. Se eliminaron, además, muestras de pacientes con expediente clínico incompleto o no disponible.

6.2 Extracción de ADN

Se obtuvieron muestras de 2 mm de diámetro mediante punción con sacabocados en la zona del tumor de cada espécimen y la extracción de ADN se realizó empleando el kit *Nucleo Spin FFPE ADN* (Macherey–Nagel, Düren, Alemania). El procedimiento inició con una desparafinización utilizando una solución disolvente e incubación a 60° C por 3 min, seguido de un proceso de lisis celular con un buffer de lisis y proteinasa K e incubación durante toda la noche. Después, se añadieron 100 µL del buffer D-Link para eliminar la reticulación y se incubó durante 30 min a 90°C. Posteriormente se utilizaron las columnas incluidas en el kit para la purificación del ADN realizando un par de lavados, para finalmente eluir utilizando 20 µL de agua inyectable. La concentración y pureza del ADN obtenido de cada extracción fue estimada mediante las relaciones de absorbancia A260/A280 y A260/A230 obtenidas en el NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, DE, EUA). Todas las muestras de ADN fueron almacenadas a -20 °C hasta su posterior empleo.

6.3 Detección de Citomegalovirus por qPCR

La detección de ADN del CMV se realizó mediante qPCR empleando oligonucleótidos y sondas de hidrólisis reportados anteriormente para la amplificación de una región de 72 pb del gen de la glicoproteína B (gB) (**Tabla 1**) (Afshar et al., 2016).

Tabla 1. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de un fragmento de 72 pb del gen gB del CMV.

	Secuencias de oligonucleótidos	Tm (°C)
OligoF	5'- AGG TCT TCA AGG AAC TCA GCA AGA -3'	58
Sonda	6FAM 5'- AAC CCG TCA GCC ATT CTC TCG GC -3' TAMRA	63
OligoR	5'- CGG CAA TCG GTT TGT TGT AAA -3'	55

Las reacciones de qPCR se realizaron utilizando el reactivo GoTaq Probe qPCR Master Mix (Promega, WI, E.U.A.) siguiendo las instrucciones presentadas por el fabricante en el termociclador Light Cycler (Roche) de la Unidad de Genómica del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS) de la UANL. El programa de amplificación inició con de activación de la polimerasa a 95 °C por 2 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C por 15 seg y 60 °C por 1 min.

```

5'- AGG TCT TCA AGG AAC TCA GCA AGA TCA ACC GGT CAG CCA TTC TCT CGG CCA TTT ACA ACA AAC CGA TTG
CCG TTT TTT TTT GAG CCC GAC TTT ACC ATC CAG TAC CGC AAC AAG ATT ATC GAT ACC GCC GGC TGT TTT TTT
TTT AGT CAG GCA AGC CTA TGA CAT GGT AAT GCC TAG AAG TAA AGA AAG GTT AGT CAT AGT AGC TTA GCT GAA
CTG GGC CGT GGG GGT CGT CAT CAT CTC CAC CGG AAC CAG TTT TTT TTT AGC TGT AAC TGT GGT TTC CAT GAC
GCT GCT GCT ACT GGC TTT CGT CCT CTG GCT CTC TTC GCC AGG GGG C -3'
  
```

Figura 9. Secuencia del bloque sintético de ADN diseñado para emplearse como control positivo de amplificación del CMV. Se resalta el amplicón del gen gB del CMV.

Las reacciones de qPCR se realizaron utilizando el reactivo GoTaq Probe qPCR Master Mix (Promega, WI, E.U.A.) siguiendo las instrucciones presentadas por el fabricante en el termociclador Light Cycler (Roche) de la Unidad de Genómica del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS) de la UANL. El programa de amplificación inició con de activación de la polimerasa a 95 °C por 2 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C por 15 seg y 60 °C por 1 min.

6.4 Evaluación de la expresión de p53 mediante inmunohistoquímica

Se realizaron cortes histológicos de 4 µm con un micrótopo semiautomático (Leica RM2125 RTS) y el tejido fue colocado en portaobjetos recubiertos de 3-aminopropiltriétoxissilano (APTS). Como control de tinción para cada laminilla se

utilizó tejido de carcinoma de mama. Las laminillas se incubaron a 60°C durante 12-15 horas para fijar el tejido.

El protocolo de inmunohistoquímica se inició después de un tratamiento de desparafinización del tejido incubando cada laminilla en una cubeta de tinción con xilol durante 5 min. Posteriormente, el tejido se hidrato sumergiéndolo durante 3 min en cubetas con distintas concentraciones de alcoholes iniciando con etanol absoluto, seguido de alcohol 90%, alcohol 80%, agua destilada y finalmente en solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Una vez terminada la hidratación del tejido, se utilizó el equipo PT Link (Dako) para la recuperación antigénica en solución tamponada Tris-EDTA (pH 9) a una temperatura de 92°C durante 20 min. Finalizada la recuperación antigénica se realizó la inmunotinción utilizando el Mouse and Rabbit specific HRP/DAB (ABC) Detection IHC Kit (Abcam, Cambridge, UK). Cada laminilla se colocó en una cámara de humedad para posteriormente añadirles peróxido de hidrógeno y se dejaron reposar durante cinco minutos. Después, se lavaron durante tres min en solución PBS. Luego del lavado, cada corte fue cubierto con la solución bloqueadora de proteína y se incubó durante cinco min. Posteriormente, se lavó durante tres min en solución PBS. La inmunodetección se realizó con el anticuerpo monoclonal Anti-p53 [E26] (ab32389) (Abcam) preparado a una concentración de 1:100. El anticuerpo se colocó cubriendo el corte completamente durante 30 min y se lavó con solución PBS por 3 min. A continuación se colocó el anticuerpo secundario biotinilado contenido en el Kit de detección durante 10 min, para posteriormente realizar un lavado de 3 min en PBS. Una vez realizado el lavado se utilizó la estreptavidina peroxidasa durante 10 min y un lavado de 5 min en PBS. La 3,3'-diaminobenzidina (DAB) se preparó mezclando 30 µL de cromógeno DAB por cada mililitro de sustrato DAB, ambos del Kit de detección, para después ser colocado durante 5 min a cada laminilla. Todas las laminillas fueron sumergidas cinco veces en agua de grifo para remoción del DAB. La contratinción se realizó con en hematoxilina durante 40 seg para luego repetir el paso de lavado con agua de grifo. Finalmente, se realizó una deshidratación sumergiéndolo durante 3 min en cubetas con distintas concentraciones de alcoholes iniciando con alcohol al 80%, alcohol al 96%, etanol absoluto y posteriormente en xilol por duplicado. Una vez terminada la deshidratación con alcohol el tejido se sello con una gota de resina sobre el tejido y colocando un cubreobjetos evitando la formación de burbujas.

Evaluación de la expresión de p53

La evaluación de cada inmunohistoquímica se realizó en un microscopio óptico por un médico especialista en patología clínica, quien determinó el porcentaje de expresión de p53 con base en el grado de tinción nuclear. Las muestras con menos del 10% de las células teñidas fueron consideradas como negativas para la expresión de p53 y las muestras positivas fueron catalogadas en expresión baja (10-25% de células teñidas), expresión moderada (26-50%), y expresión alta (>50%).

6.5 Evaluación de metilaciones en el promotor de TP53

Se empleó el EZ DNA Methylation-Lightning Kit (ZymoResearch, CA, E.U.A.) para la modificación mediada por bisulfito de citosinas no metiladas a uracilos. Se añadieron de 130 μ L de Lightning Conversion Reagent a cada una de las muestras de ADN extraído y normalizadas a 1000 ng en un volumen de 20 μ L. Posteriormente, se colocaron en el termociclador con el programa indicado por el fabricante (**Tabla 2**).

Tabla 2. Programa de transformación indicado por el fabricante

Temperatura	Tiempo
98°C	8 minutos
54°C	60 minutos
4°C	Almacenamiento (Máximo 20 horas)

Una vez finalizado la transformación se colocó una Zymo-Spin™ IC Column en un tubo de recolección de 2 mL, luego se añadieron 600 μ L de M-Binding Buffer y la muestra previamente transformada dentro de la columna para ser mezclada por inmersión. La columna se centrifugó a 10,000 x g durante 30 seg. El contenido del tubo de recolección se descartó y se añadieron 100 μ L M-Wash Buffer a la columna, después se centrifugó a 10,000 x g durante 30 seg. Posteriormente, se añadieron 200 μ L de L-Desulphonation Buffer y se incubó a temperatura ambiente durante 20 min y después se centrifugó a 10,000 x g durante 30 seg. El contenido del tubo de recolección se descartó y se realizaron un par de lavados añadiendo 200 μ L M-Wash Buffer a la columna y centrifugando a 10,000 x g durante 30 seg. Finalmente, se añadieron 10 μ L de agua inyectable y se centrifugó a 10,000 x g durante 30 seg. La muestra eluida se almacenó a -20°C hasta su uso posterior.

Amplificación por PCR específica para metilaciones (MSP)

El perfil de metilaciones del promotor del gen TP53 se determinó mediante la técnica de PCR específica para metilaciones (MSP; *Methylation Specific PCR*) usando cebadores específicos previamente publicados para la amplificación de regiones modificadas y no modificadas por bisulfito (Saeed et al., 2019) (**Tabla 3**). Se preparó una solución de trabajo de 10 μ M para cada uno de los cebadores.

Tabla 3. Características de los cebadores dirigidos al promotor del gen TP53.

Amplicón	Cebador	Oligonucleótido	Tm(°C)
p53-Met 193 pb	OligoF	5'- TTCGGTAGGCGGATTATTTG -3'	58
	OligoR	5'- AAATATCCCCGAAACCCAAC -3'	
p53-Umet 247 pb	OligoF	5'- TTGGTAGGTGGATTATTTGTTT -3'	53
	OligoR	5'- CCAATCCAAAAAACATATCAC -3'	

Cada reacción de MSP fue preparada usando la enzima TaKaRa EpiTaq™ HS (Takara, USA) en las condiciones indicadas en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Composición de la mezcla de PCR utilizando TaKaRa EpiTaq™ HS

	1x
Muestra	2ul
10X EpiTaq PCR Buffer (Libre de Mg ²⁺)	2.5ul
MgCl ₂	3ul
dNTPs	3ul
EpiTaq HS (5 U/ μ L)	0.125ul
Cebador Sentido	0.5ul
Cebador antisentido	0.5ul
Agua inyectable	14.375ul

Para cada reacción de PCR se incluyeron como control negativo una reacción con agua libre de nucleasas y el control positivo comercial Human Methylated & Non-methylated DNA Set (Zymo Research, Orange, CA, E.U.A.). El programa de PCR utilizado se muestra en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Programa de PCR para el termociclador

	Ciclos	Tm	Tiempo
Desnaturalización inicial	1	94°C	5 min
Desnaturalización		94°C	30 seg
		60°C Metilado	
Alineamiento		53°C No metilado	30 seg
Extensión	40	72°C	30 seg
Extensión final	1	72°C	7 min

Finalmente, el producto de PCR se analizó en un gel de agarosa al 2.5%, utilizando buffer TBE al 1X. El gel se sumergió en bromuro de etidio y se visualizó en un transiluminador de luz UV.

6.6 Análisis estadístico

Se analizaron las características clínicas en los expedientes médicos de los pacientes. Toda la información obtenida se muestra en frecuencias absolutas, porcentajes o medianas y rangos. Para el análisis de resultados se utilizaron las pruebas de U de Mann-Whitney, X^2 de Pearson, la prueba exacta de Fisher y H de Kruskal Wallis. Se consideró como significativo un valor de $p < 0.05$. Para el análisis de supervivencia se utilizó el análisis de Kaplan-Meier. Todos los análisis se realizaron empleando el programa IBM SPSS Statistics (Versión 26, SPSS. Inc., Chicago, E.U.A.).

7. RESULTADOS

7.1 Población de estudio

El estudio fue realizado a partir de los tejidos FFpE de 110 pacientes con diagnóstico de GBM. Un total de 61 casos cumplieron con las características que definen a un GBM, además de contar con el historial clínico completo (**Figura 10**).

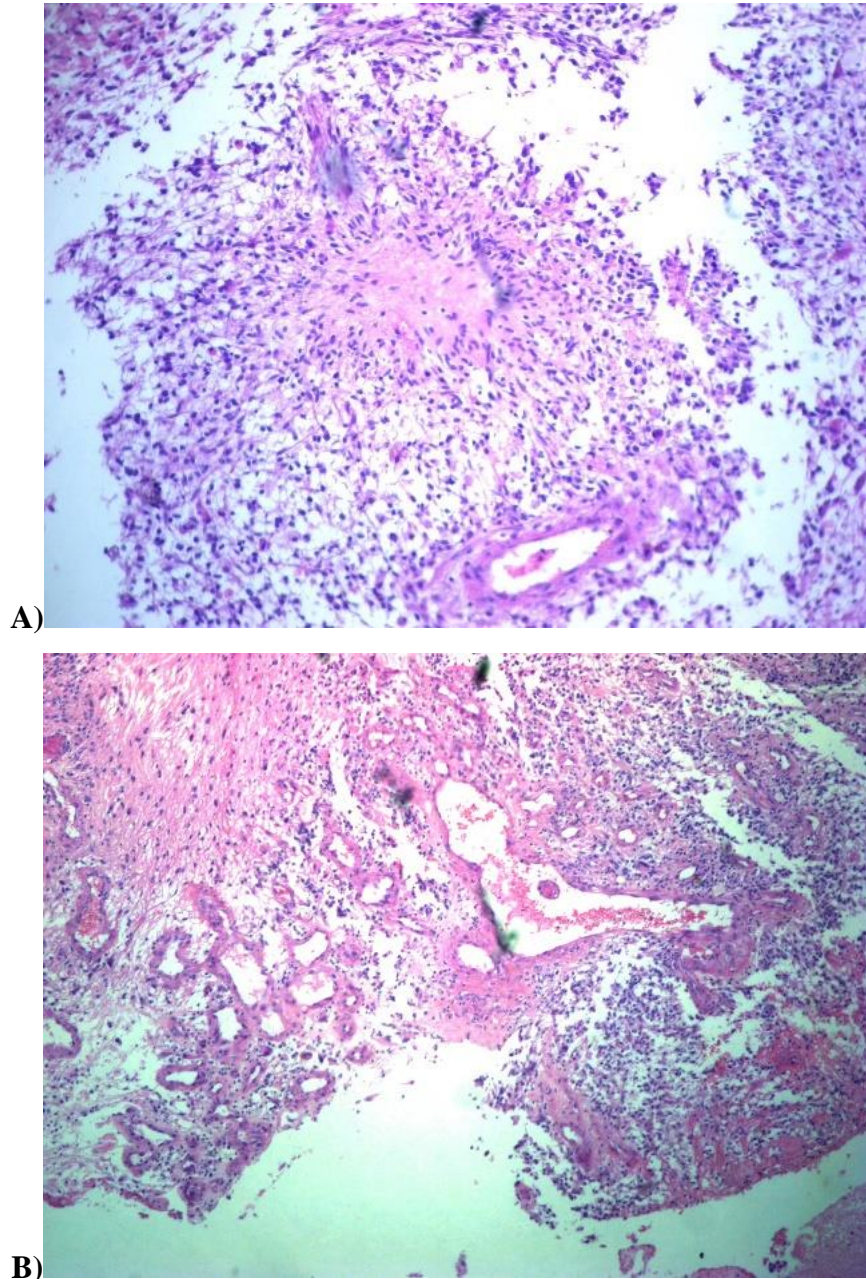


Figura 10. Características clásicas de un Glioblastoma multiforme. A) Necrosis en empalizada. B) Hiperplasia endotelial.

De los 61 casos incluidos, 25 (40.1%) correspondieron al grupo de edad de mayores de sesenta y cinco años y el 55.7% fueron del género masculino. Además, la

media de supervivencia fue de 12.9 meses, solamente 25 (41.0%) sobrevivieron más de 12 meses una vez realizado el diagnóstico. El principal sitio de localización del tumor fue el hemisferio central derecho (HCD) con 33 (54.1%) seguido del hemisferio central izquierdo (HCI) con 25 (41.0%). Un total de 24 (39.3%) de los 61 pacientes tuvieron una recidiva tumoral y 3 (4.9%), 6 (9.8%), 23 (37.7%) y 29 (47.6%) recibieron como tratamiento quimioterapia, radioterapia, ambas o ninguna, respectivamente (**Tabla 6**).

Tabla 6. Características clínicas de 61 pacientes con GBM.

		Total
Edad		56 (6-83)
Edad ≥65 años		25 (40.1%)
Genero		
	Masculino	34 (55.7%)
	Femenino	27 (44.3%)
Supervivencia		
	≥12 meses	25 (41.0% %)
	<12 meses	36 (59.0%)
Localización		
	HCD	33 (54.1%)
	HCI	25 (41.0%)
	LM	3 (4.9%)
Resección quirúrgica		
	Total	7 (11.5%)
	Subtotal	25 (41.0%)
	Parcial	29 (47.5%)
Recidiva		
	Si	24 (39.3%)
	No	37 (60.7%)
ECOG^a		
	0 ^b	1 (1.6%)
	1 ^c	13 (21.3%)
	2 ^d	6 (9.8%)
	3 ^e	17 (27.9%)
	4 ^f	24 (39.4%)
	5 ^g	-
Tratamiento		
	QT	3 (4.9%)
	RT	6 (9.8%)
	Ambas	23 (37.7%)
	Ninguna	29 (47.6%)

^a Escala de funcionalidad utilizada en pacientes con cáncer. Obtenido de Cruz & Acevedo, 2014.

^b Completamente activo, capaz realizar todas las actividades previas a la enfermedad, sin restricción.

^c Restringido en actividad física extrema, capaz de caminar y realizar trabajos livianos.

^d Capaz de caminar y de autocuidado, pero incapaz de realizar cualquier tipo de trabajo.

^e Capaz de autocuidado limitado, se mantiene postrado o en silla más de 50% de las horas que está despierto.

^f Completamente incapacitado. No puede realizar autocuidado. Totalmente confinado en cama o silla.

^g Muerte.

7.2 Detección de CMV en pacientes con GBM

Los 61 casos incluidos en el estudio resultaron negativos para el gen gB del CMV (**Figura 11**).

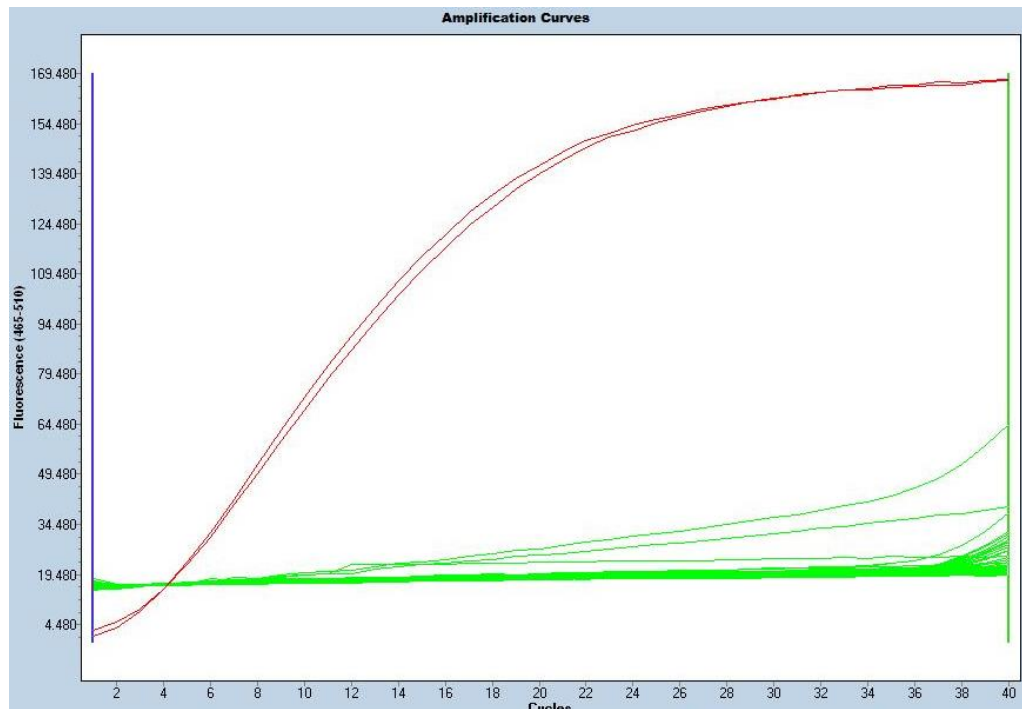


Tabla 11. Curva de amplificación del gen gB del CMV en los casos de GBM. Las líneas rojas corresponden al control positivo (Bloque de ADN genómico) y las líneas verdes corresponden a las muestras de GBM.

7.3 Evaluación de la expresión de p53 en pacientes con GBM

La valoración de las 61 laminillas con IHQ para p53 incluyó la determinación de la expresión de p53 (>10% de tinción nuclear), las tinciones positivas se clasificaron como expresión baja (10-25%), expresión moderada (26-50%) y expresión alta (>51%) (**Figura 12-15**).

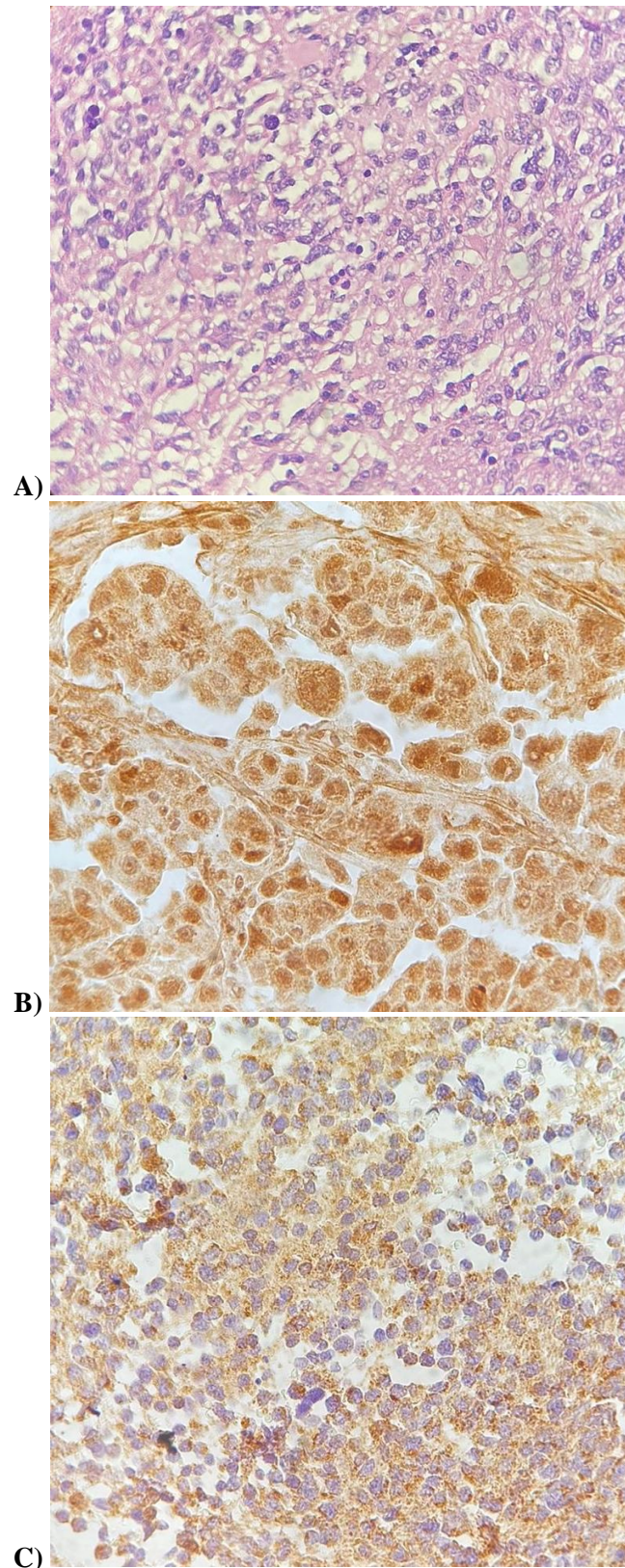


Figura 12. Tinción IHQ para p53 en GBM del paciente No. 18. **A)** Tinción del tumor con hematoxilina y eosina. **B)** Expresión de p53 por IHQ en carcinoma de mama. **C)** Expresión nuclear de p53 (Expresión negativa) por IHQ en GBM.

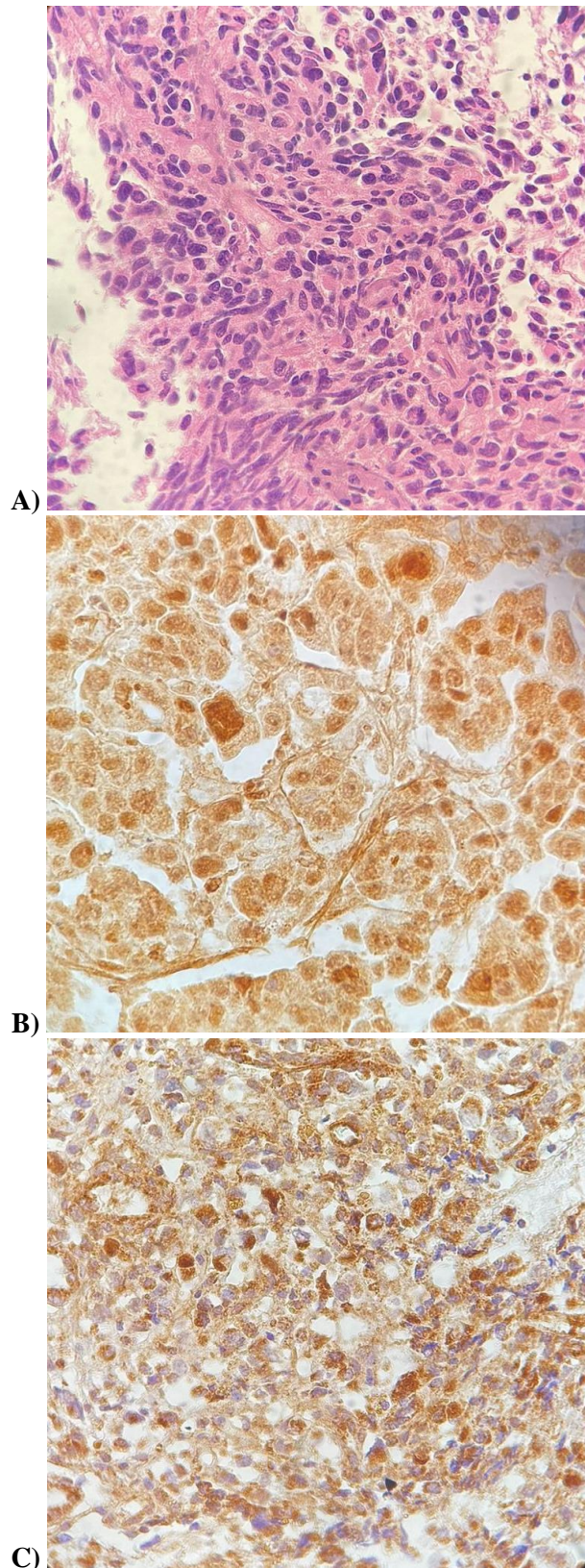


Figura 13. Tinción IHQ para p53 en GBM del paciente No. 17. **A)** Tinción del tumor con hematoxilina y eosina. **B)** Expresión de p53 por IHQ en carcinoma de mama. **C)** Expresión nuclear de p53 (Expresión baja) por IHQ en GBM.

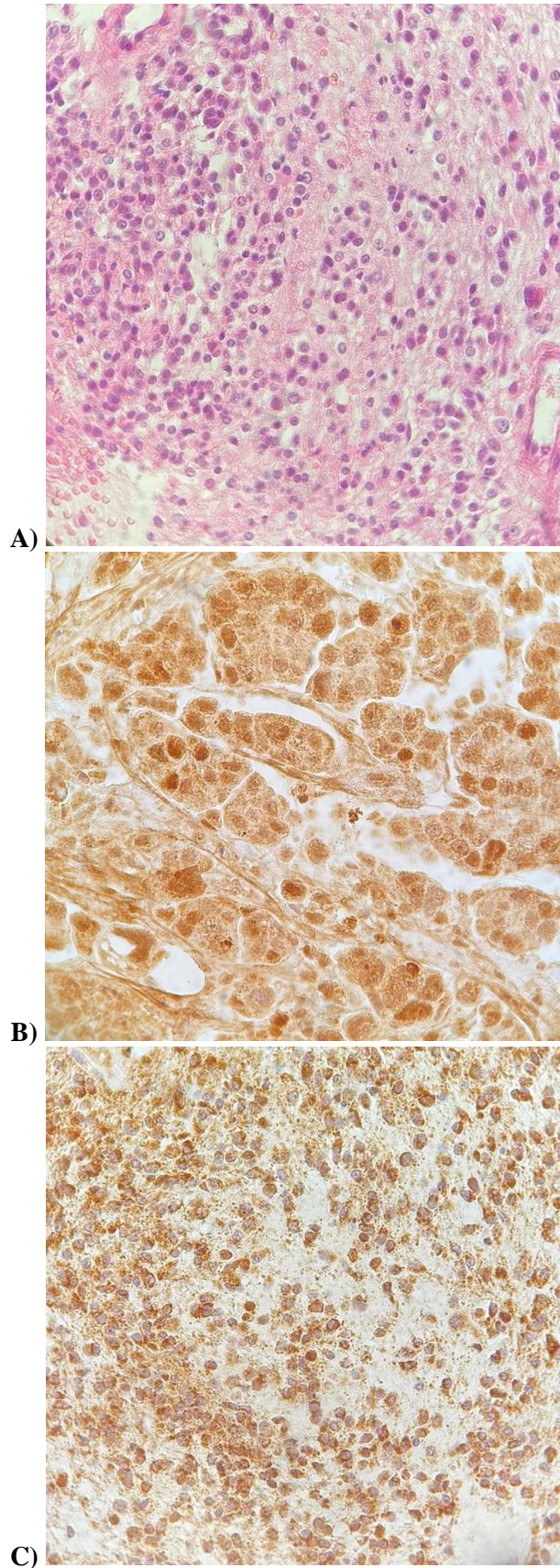


Figura 14. Tinción IHQ para p53 en GBM del paciente No. 13. **A)** Tinción del tumor con hematoxilina y eosina. **B)** Expresión de p53 por IHQ en carcinoma de mama. **C)** Expresión nuclear de p53 (Expresión moderada) por IHQ en GBM.

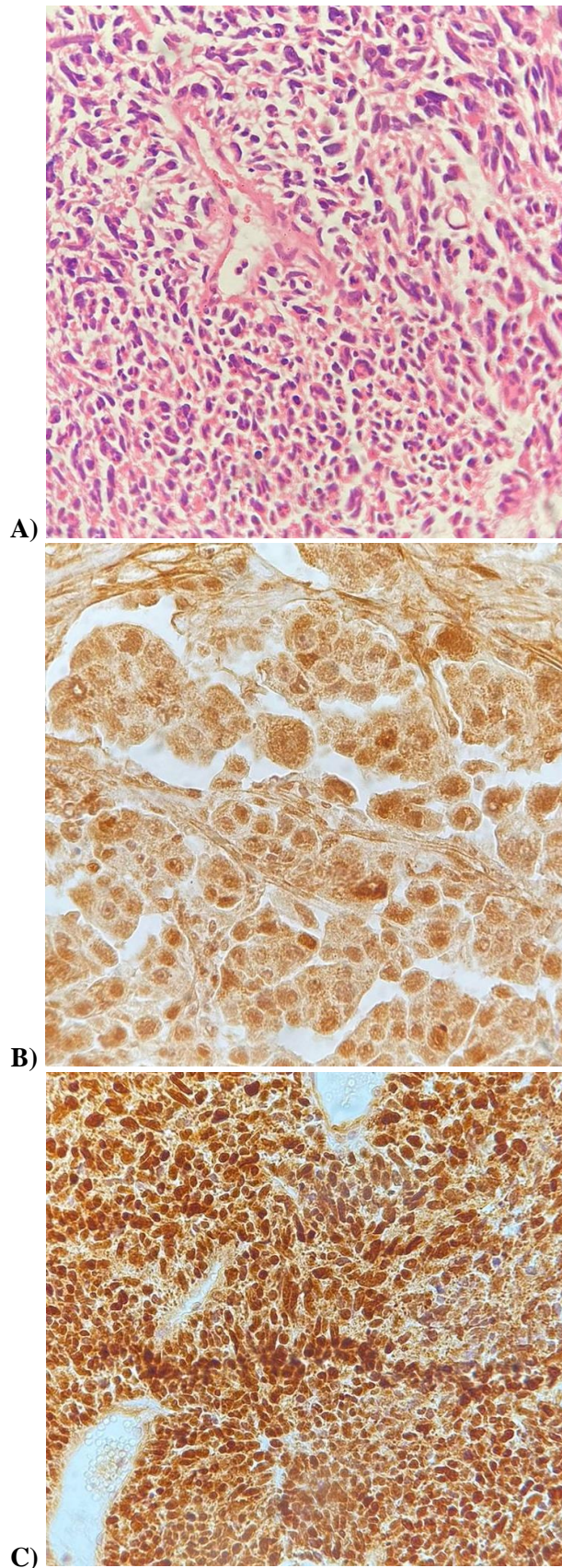


Figura 15. Tinción IHQ para p53 en GBM del paciente No. 19. **A)** Tinción del tumor con hematoxilina y eosina. **B)** Expresión de p53 por IHQ en carcinoma de mama. **C)** Expresión nuclear de p53 (Expresión alta) por IHQ en GBM.

7.4 Evaluación de la expresión de p53 con respecto a las características clínico-histopatológicas de los pacientes.

De los 61 casos en el estudio, 4 debieron ser descartados debido a nula inmunoreactividad del anticuerpo. De los 57 especímenes evaluados, 22 (38.6%) correspondieron al grupo de más de sesenta y cinco años, 8 (36.4%) de los 22 presentaron expresión negativa, mientras que en 14 (63.3%) se encontró una expresión positiva, además, la mayoría de los casos correspondieron al género masculino con 33 (57.9%), ambas características no fueron estadísticamente significativas ($p>0.05$). Se determinó que de los 33 (57.9%) casos que sobrevivieron menos de doce meses 13 (39.4%) fueron negativos a la expresión, mientras que 20 (60.6%) resultaron positivos, esto represento una diferencia significativa marginal ($p=0.083$). La localización más común fue el HCD con 9 (30%) y 21 (70%) en expresión negativa y positiva, respectivamente, sin embargo, esto no represento una diferencia significativa ($p=0.322$). Un total de 34 (59.6%) de los 57 casos no tuvieron una recidiva, 24 (64.7%) de los 34 presentaron expresión positiva para p53. La mayoría de los casos se encontraron en el grado 4 de la escala de ECOG, encontrando que 13 (61.9%) de los 21 tuvieron expresión positiva. La mayoría de los casos con expresión negativa fueron casos en donde el paciente no recibió tratamiento con 9 (36%) casos, mientras en los casos de expresión positiva la mayoría recibieron ambos tratamientos (quimioterapia y radioterapia) con 17 (73.9%) casos. La localización quirúrgica, recidiva, escala de ECOG y tratamiento no tuvieron una significancia estadística ($p>0.05$) (**Tabla 7**).

Tabla 7. Evaluación de la expresión de p53 con respecto a las características clínico-histopatológicas en 61 pacientes con GBM.

	Expresión p53			<i>P</i>
	Total (n= 57)	Negativa ^a (n=17)	Positiva ^b (n=40)	
Edad	56.6 (6-83)			.112
≥65 años	22 (38.6%)	8 (36.4%)	14 (63.6%)	.553
Género				.771
Masculino	33 (57.9%)	9 (27.3%)	24 (72.2%)	
Femenino	24 (42.1%)	8 (33.3%)	16 (66.7%)	
Supervivencia				0.083
≥12 meses	24 (42.1%)	4 (16.7%)	20 (83.3%)	
<12 meses	33 (57.9%)	13 (39.4%)	20 (60.6%)	
Localización				0.322
HCD	30 (52.6%)	9 (30%)	21 (70%)	
HCI	24 (42.1%)	8 (33.3%)	16 (66.7%)	
LM	3 (5.3%)	-	3 (100%)	
Resección quirúrgica				0.428
Total	7 (12.3%)	2 (28.6%)	5 (71.4%)	
Subtotal	23 (40.4%)	9 (39.1%)	14 (60.9%)	
Parcial	27 (43.3%)	6 (22.2%)	21 (77.8%)	
Recidiva				0.379
Si	23 (40.4%)	5 (21.7%)	18 (78.3%)	
No	34 (59.6%)	12 (35.3%)	22 (64.7%)	
ECOG ^c				0.338
0 ^d	1 (1.8%)	-	1 (100%)	
1 ^e	13 (22.8%)	5 (38.5%)	8 (61.5%)	
2 ^f	6 (10.5%)	2 (33.3%)	4 (66.7%)	
3 ^g	16 (28.1%)	2 (12.5%)	14 (87.5%)	
4 ^h	21 (36.8%)	8 (38.1%)	13 (61.9%)	
5 ⁱ	-	-	-	
Tratamiento				0.431
QT	3 (10.5%)	-	3 (100%)	
RT	6 (10.5%)	2 (33.3%)	4 (66.7%)	
Ambas	23 (40.4%)	6 (23.1%)	17 (73.9%)	
Ninguna	25 (43.9%)	9 (36%)	16 (64%)	

Valores mostrados en frecuencias absolutas (porcentaje). La edad se muestra en mediana (rango).

^a < del 10% de células teñidas.

^b ≥ del 10% de células teñidas.

^c Escala de funcionalidad utilizada en pacientes con cáncer. Obtenido de Cruz & Acevedo, 2014.

^d Completamente activo, capaz realizar todas las actividades previas a la enfermedad, sin restricción.

^e Restringido en actividad física extrema, capaz de caminar y realizar trabajos livianos.

^f Capaz de caminar y de autocuidado, pero incapaz de realizar cualquier tipo de trabajo.

^g Capaz de autocuidado limitado, se mantiene postrado o en silla más de 50% de las horas que está despierto.

^h Completamente incapacitado. No puede realizar autocuidado. Totalmente confinado en cama o silla.

ⁱ Muerte.

En la **Figura 16** se observa la gráfica de Kaplan-meier donde se comparó la supervivencia de los 57 casos en donde se evaluó la expresión de p53, se observa que los pacientes con expresión negativa a p53 tuvieron una disminución en la supervivencia, se encontró una diferencia significativa marginal (Log rank, $p= 0.093$).

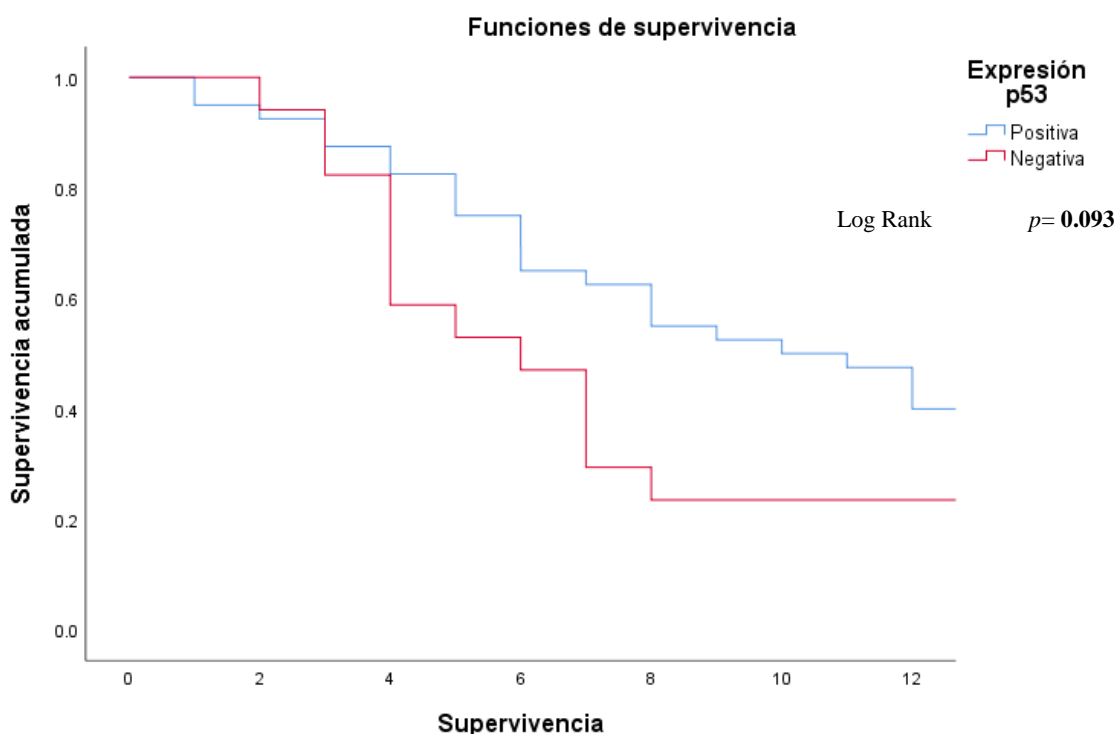


Figura 16. Análisis de Kaplan-Meier de la supervivencia a 12 meses de los pacientes con GBM en función de la expresión de la proteína p53.

De los 40 casos evaluados como positivos, se clasificaron 18, 11 y 11 como expresión baja, moderada y alta, respectivamente. La localización más común fue el HCD con 8 (38.1%), 7 (33.3%) y 6 (28.6%) en expresión baja, moderada y alta, respectivamente, se encontró una diferencia significativa ($p=0.021$). Al igual que la localización, se determinó una diferencia significativa en el tratamiento aplicado ($p=0.037$). El resto de las características clínico-histopatológicas no fueron estadísticamente significativas ($p>0.05$). De los 40 especímenes, 14 (35%) correspondieron al grupo de más de sesenta y cinco años, predominando los casos de expresión baja con 7 (50%). El género masculino tuvo 24 (60.0%) casos, encontrando que la mayoría de los casos fueron de expresión baja con 12 (50.0%) casos. Se determinaron 7 (33.3%) casos que tenían una supervivencia menor a 12 meses con expresión alta de p53, mientras que aquellos que sobrevivieron más de 12 meses con

expresión alta de p53 solamente fueron 4 (19.0%) casos. Un total de 22 (55.0%) de los 57 casos no tuvieron una recidiva. La mayoría de los casos se encontraron en el grado 3 de la escala de ECOG, encontrando 14 (35.0%) de los 40 que tuvieron expresión positiva (**Tabla 8**).

Tabla 8. Evaluación de la expresión positiva de p53 con respecto a las características clínico-histopatológicas en los 40 pacientes con GBM con expresión positiva.

	Expresión positiva p53				p
	Total (n= 40)	Baja ^a (n=18)	Moderada ^b (n= 11)	Alta ^c (n=11)	
Edad	54.5 (6-78)				0.729
Edad ≥65 años	14 (35%)	7 (50.0%)	4 (28.6%)	3 (21.4%)	0.808
Genero					0.737
Masculino	24 (60%)	12 (50.0%)	6 (25.0%)	6 (25.0%)	
Femenino	16 (40%)	6 (37.5%)	5 (31.25%)	5 (31.25%)	
Supervivencia					0.441
≥12 meses	20 (50%)	9 (42.9%)	7 (33.3%)	4 (19.0%)	
<12 meses	20 (50%)	9 (42.9%)	4 (19.0%)	7 (33.3%)	
Localización					0.234
HCD	21 (52.5%)	8 (38.1%)	7 (33.3%)	6 (28.6%)	
HCI	16 (40.0%)	9 (56.2%)	2 (12.5%)	5 (31.3%)	
LM	3 (7.5%)	1 (33.3%)	2 (66.7%)	-	
Resección quirúrgica					0.021
Total	5 (12.5%)	1 (20.0%)	4 (80.0%)	-	
Subtotal	14 (35.0%)	9 (64.3%)	3 (21.4%)	2 (14.3%)	
Parcial	21 (52.5%)	8 (38.1%)	4 (19.0%)	9 (42.9%)	
Recidiva					0.771
Si	18 (45.0%)	9 (50.0%)	4 (22.2%)	5 (27.8%)	
No	22 (55.0%)	9 (40.9%)	7 (31.8%)	6 (27.3%)	
ECOG ^d					0.785
0 ^e	1 (2.5%)	-	1 (100.0%)	-	
1 ^f	8 (20.0%)	4 (50.0%)	2 (25.0%)	2 (25.0%)	
2 ^g	4 (10.0%)	2 (50.0%)	1 (25.0%)	1 (25.0%)	
3 ^h	14 (35.0%)	8 (57.2%)	3 (21.4%)	3 (21.4%)	
4 ⁱ	13 (32.5%)	4 (30.8%)	4 (30.8%)	5 (38.4%)	
5 ^j	-	-	-	-	
Tratamiento					0.037
QT	3 (7.5%)	3 (100.0%)	-	-	
RT	4 (10.0%)	1 (25.0%)	-	3 (75%)	
Ambas	17 (42.5%)	8 (47.0%)	7 (41.2%)	2 (11.8%)	
Ninguna	16 (40.0%)	6 (37.5%)	4 (25.0%)	6 (37.5%)	

Valores mostrados en frecuencias absolutas (porcentaje). La edad se muestra en mediana (rango).

^a 10-25% de células teñidas.

^b 26-50% de células teñidas.

^c ≥ del 51% de células teñidas.

^d Escala de funcionalidad utilizada en pacientes con cáncer. Obtenido de Cruz & Acevedo, 2014.

^e Completamente activo, capaz realizar todas las actividades previas a la enfermedad, sin restricción.

^f Restringido en actividad física extrema, capaz de caminar y realizar trabajos livianos.

^g Capaz de caminar y de autocuidado, pero incapaz de realizar cualquier tipo de trabajo.

^h Capaz de autocuidado limitado, se mantiene postrado o en silla más de 50% de las horas que está despierto.

ⁱ Completamente incapacitado. No puede realizar autocuidado. Totalmente confinado en cama o silla.

^j Muerte.

En la **Figura 17** se observa la gráfica de Kaplan-meier donde se comparó la supervivencia de los 40 casos donde se evaluó la expresión de p53 como positiva, se observa que los pacientes con expresión alta de p53 tuvieron una ligera disminución en la supervivencia comparado con los grupos de expresión baja y moderada, sin embargo, no fue significativo (Log rank, $p= 0.418$).

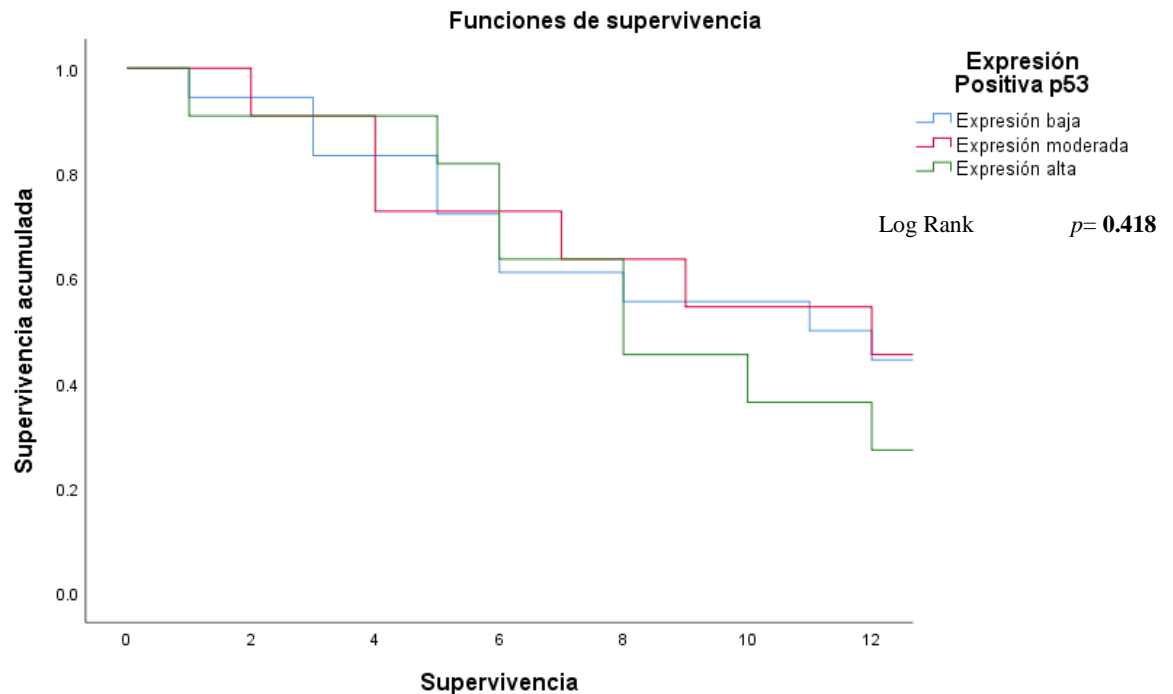


Figura 17. Análisis de Kaplan-Meier de la supervivencia a 12 meses de los pacientes con GBM en función de la expresión positiva de la proteína p53.

7.5 Evaluación del estado de metilación del promotor del gen TP53 en pacientes con GBM

El estado de metilación se determinó con la técnica MSP de muestras convertidas mediante bisulfito, si amplificó con los cebadores específicos para regiones transformadas se determinó como no metilado, si amplificó con los cebadores específicos para regiones no transformadas se determinó como metilado y mientras que si amplificó con ambos cebadores se definió como metilado (**Figura 18-19**).

En la **Figura 18** se ve en el carril 5 y 7 la amplificación del fragmento de 247 pb correspondiente al amplicon del ADN no metilado, esto indica que las muestras 36 y 37 no tienen metilaciones en el promotor de TP53. En la **Figura 19** se observa en los carriles 4 y 5 la amplificación del fragmento de 193 pb correspondiente al amplicon del ADN metilado, esto indica que las muestras 20 y 21 tienen el promotor de TP53 metilado.

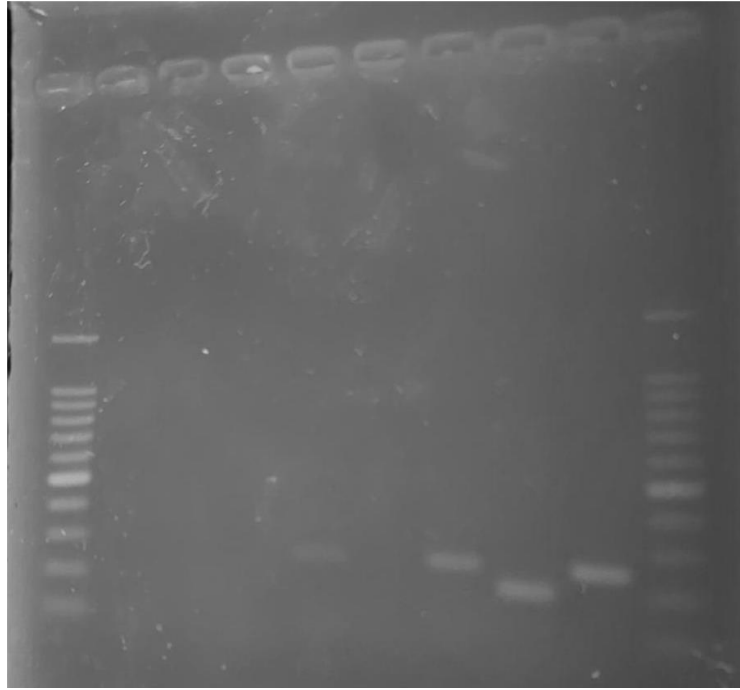


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5%. Carril 1: Marcador molecular 100 pb, carril 2: control negativo-M, carril 3: control negativo-UM, carril 4: Muestra 35-M, carril 5: Muestra 35-UM, carril 6: muestra 36-M, carril 7: muestra 36-UM, carril 8: control positivo M, carril 9: control positivo-UM y carril 10: marcador de peso molecular 100 pb. M: Cebadores dirigidos a regiones metilados y UM: cebadores dirigidos a regiones no metilados.

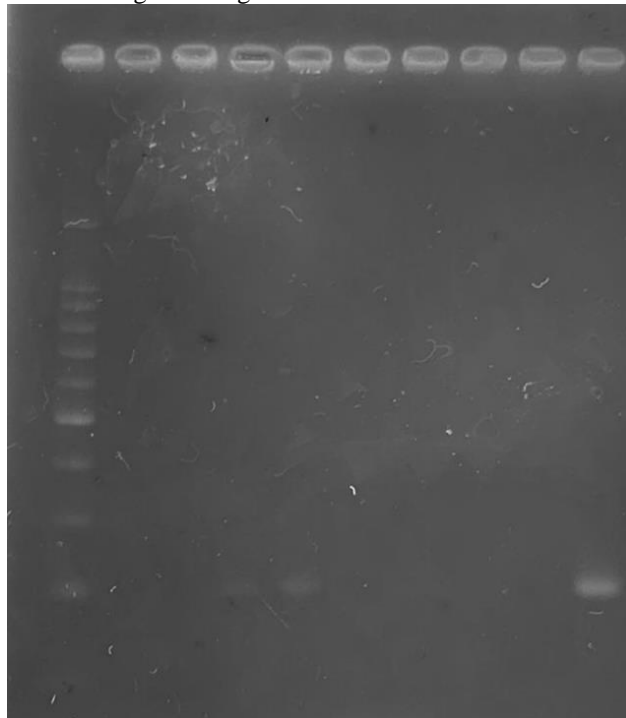


Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5%. Carril 1: Marcador molecular 100 pb, carril 2: control negativo-M, carril 3: muestra 15-M, carril 4: Muestra 20-M, carril 5: Muestra 21-M, carril 6: muestra 22-M, carril 7: muestra 23-UM, carril 8: muestra 24-M, carril 9: muestra 27-M y carril 10: control positivo-M. M: Cebadores dirigidos a regiones metilados.

7.6 Evaluación del estado de metilación del promotor del gen TP53 con respecto a las características clínico-histopatológicas de los pacientes.

De los 61 casos en el estudio, se determinó el estado de metilación del promotor del gen TP53 de 41 casos, encontrando 20 casos no metilados y 21 metilados. Se observó una diferencia significativa en la edad ($p=0.05$) respecto al estado de metilación de TP53. De los 41 especímenes evaluados, 18 (43.9%) correspondieron al grupo de más de sesenta y cinco años representando una diferencia significativa ($p=0.039$), y la proporción fue mayor en hombres con 23 (56.1%), sin embargo, esto no representó una diferencia estadística ($p=0.350$). De los 41 casos evaluados, 23 (56.1%) sobrevivieron menos de 12 meses, 12 (52.2%) de los 23 fueron metilados, esto no fue estadísticamente significativo ($p=1.000$). La mayoría de los casos de los casos que no tuvieron una recidiva fueron metilados con 15 (55.6%), mientras que los que tuvieron una recidiva fueron más casos no metilados con 8 (57.1%), sin embargo, este hallazgo no fue estadísticamente significativo ($p=0.520$). El único caso que recibió quimioterapia fue no metilado, los 3(100%) casos que recibieron radioterapia correspondieron a casos metilados, mientras que la mayoría que recibió ambos tratamientos fueron metilados con 9 (52.9%). No se encontró una diferencia significativa en la relación de la localización, resección quirúrgica, la escala de ECOG y el estado de metilación del promotor del gen TP53 ($p>0.05$) (**Tabla 9**).

Tabla 9. Evaluación del estado de metilación del promotor del gen TP53 con respecto a las características clínico-histopatológicas en los 40 pacientes con GBM con expresión positiva.

	Estado de metilación			<i>p</i>
	Total (n= 41)	Metilado (n=21)	No metilado (n=20)	
Edad	56 (7- 83 años)			0.050
Edad ≥65 años	18 (43.9%)	11 (61.1%)	7 (38.9%)	0.039
Genero				0.350
Masculino	23 (56.1%)	10 (43.5%)	13 (56.5%)	
Femenino	18 (43.9%)	11 (61.1%)	7 (38.9%)	
Supervivencia				1.000
≥12 meses	18 (43.9%)	9 (50.0%)	9 (50.0%)	
<12 meses	23 (56.1%)	12 (52.2%)	11 (47.8%)	
Localización				0.224
HCD	22 (53.6%)	12 (54.5%)	10 (45.5%)	
HCI	17 (41.5%)	9 (52.9%)	8 (47.1%)	
LM	2 (4.9%)	-	2 (100.0%)	
Resección quirúrgica				0.552
Total	6 (11.6%)	2 (33.3%)	4 (66.7%)	
Subtotal	17 (41.5%)	10 (58.8%)	7 (41.2%)	
Parcial	18 (43.9%)	9 (50.0%)	9 (50.0%)	
Recidiva				0.520
Si	14 (34.1%)	6 (42.9%)	8 (57.1%)	
No	27 (65.9%)	15 (55.6%)	12 (44.4%)	
ECOG ^a				0.740
0 ^b	1 (2.4%)	-	1 (100.0%)	
1 ^c	10 (24.4%)	5 (50.0%)	5 (50.0%)	
2 ^d	5 (12.2%)	2 (40.0%)	3 (60.0%)	
3 ^e	12 (29.3%)	7 (58.3%)	5 (41.7%)	
4 ^f	13 (31.7%)	7 (53.8%)	6 (46.2%)	
5 ^g	-	-	-	
Tratamiento				0.123
QT	1 (2.4%)	-	1 (100.0%)	
RT	3 (7.3%)	3 (100.0%)	-	
Ambas	17 (41.5%)	9 (52.9%)	8 (47.1%)	
Ninguna	20 (48.8%)	9 (45.0%)	11 (55.0%)	

^a Escala de funcionalidad utilizada en pacientes con cáncer. Obtenido de Cruz & Acevedo, 2014.

^b Completamente activo, capaz realizar todas las actividades previas a la enfermedad, sin restricción.

^c Restringido en actividad física extrema, capaz de caminar y realizar trabajos livianos.

^d Capaz de caminar y de autocuidado, pero incapaz de realizar cualquier tipo de trabajo.

^e Capaz de autocuidado limitado, se mantiene postrado o en silla más de 50% de las horas que está despierto.

^f Completamente incapacitado. No puede realizar autocuidado. Totalmente confinado en cama o silla.

^g Muerte.

En la **Figura 20** se observa la gráfica de Kaplan-meier donde se comparó la supervivencia de los 41 casos donde se determinó el estado de metilación del promotor del gen TP53, no se observa una diferencia significativa en la supervivencia de los casos metilados y no metilados (Log rank, $p= 0.303$).

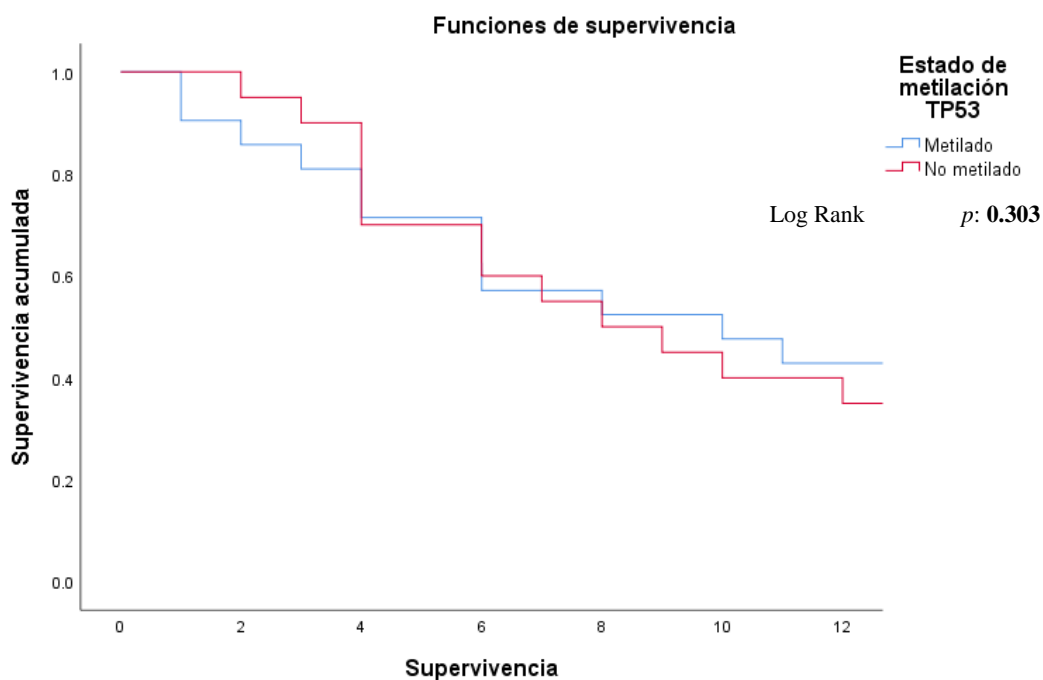


Figura 20. Análisis de Kaplan-Meier de la sobrevida a 12 meses de los pacientes con GBM en función del estado de metilación del promotor del gen TP53 p53.

En la **Tabla 10** se observa la correlación del estado de metilación con la expresión de p53 en 38 casos con GBM, se observa que no existió una diferencia significativa ($p=1.000$)

Tabla 10. Estado de metilación de 38 pacientes con GBM y su relación con la expresión de p53.

	Total (n=38)	Expresión de p53		p
		Positiva (n=28)	Negativa (n=10)	
Estado de metilación				1.000
Metilado	19 (50.0%)	14 (73.7%)	5 (23.3%)	
No metilado	19 (50.0%)	14 (73.7%)	5 (23.3%)	

7 DISCUSION

El Glioblastoma Multiforme es el tumor del sistema nervioso central más común, representa aproximadamente el 50% de todos los tumores del sistema nervioso central, además de ser muy agresivo debido a que los pacientes tienen una sobrevida de 12 a 15 meses una vez realizado el diagnóstico (Krex et al., 2007; Tamimi et al., 2017). Actualmente los únicos factores de riesgo asociados al desarrollo o progresión tumoral son la radiación ionizante y ciertos trastornos genéticos hereditarios, se ha buscado la relación de otros factores como agentes infecciosos, medicamentos, traumatismo craneoencefálico, transfusión de sangre, cirugía, anestesia y factores de estilo de vida como la dieta, sin embargo, estos no han sido concluyentes (Nelson et al., 2012). La infección por virus oncomoduladores como CMV o EBV con la aparición o progresión del Glioblastoma multiforme, aunque esto ha sido causa de controversia debido a que la prevalencia encontrada es de 0 a 100% (Rahman et al., 2019).

El objetivo del presente estudio fue identificar la prevalencia de la infección por CMV, así como el estado de metilación del promotor del gen TP53 y su expresión en tejido tumoral de pacientes con Glioblastoma Multiforme de una unidad médica de tercer nivel de atención del noreste de México. Actualmente los reportes que describen la prevalencia de la infección por HCMV son controversiales, además, ya se ha reportado que el gen TP53 puede presentar mutaciones en el 30% de los casos, sin embargo, pocos han buscado si las metilaciones pueden jugar un papel importante en la expresión de la proteína de supresión tumoral p53. Todos los especímenes de tejido tumoral del sistema nervioso central que conformaron el grupo de estudio tuvieron un diagnóstico de GBM y corresponden a muestras tomadas y procesadas en el período del 1 de enero de 2016 al 31 de diciembre del 2019 del Departamento de Neurocirugía y el Departamento de Patología de la Unidad Médica de Alta Especialidad No. 25 del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Diversos estudios establecieron que la mayoría de los casos de GBM fueron pacientes con un rango de edad 55 a 60, los casos tienen una incidencia mayor en hombres que en mujeres y la sobrevida de muchos pacientes es de 14 a 15 meses (Grech et al., 2020; Hanif et al., 2017). Nuestros resultados concuerdan con los reportes ya que la mediana fue de 56 años, el 56.7% de los casos fueron hombres y el 59% presentaron una sobrevida menor a 12 meses. Mas del 90% de los pacientes diagnosticados con GBM

pueden recurrir al tumor (Roy et al., 2015), sin embargo, en este estudio solamente 24 (39.3%) de los 61 especímenes tuvieron una recidiva. En un estudio de 2018 se clasificó el grado de ECOG del 0-1 con 45 (59.2%) pacientes con GBM y del 2-5 con 31 (40.8%) (Lee et al., 2018), nuestros resultados no concuerdan que lo reportado debido a que tenemos 14 (23%) casos correspondientes del grado 0-1 y 47 (77%).

Además, los tratamientos utilizados en pacientes con GBM son la radioterapia y quimioterapia, siendo uno de los tratamientos más aplicados el uso de radioterapia con la temozolamida como adyuvante (Vilà et al., 2014). Los tratamientos aplicados a los casos en este estudio fueron quimioterapia, radioterapia, ambas terapias y ninguna teniendo 4.9%, 9.8%, 37.7% y 47.6%, respectivamente. Adicionalmente, se ha reportado que los gliomas se encuentran más comúnmente en el hemisferio derecho (51%) que en el izquierdo (40%) (Larjavaara et al., 2007). Nuestros resultados concuerdan ya que el 54.1% se encontraban en el hemisferio derecho, mientras que 41.0% lo presentaron en el hemisferio izquierdo.

El HCMV es un herpesvirus que tiene una seroprevalencia del 50 al 90% de la población, es considerado un virus oncomodulador debido a que interactúa con el ciclo celular del huésped para así crear el entorno óptimo para la expresión génica viral, la replicación del ADN y la producción de virus infecciosos. El genoma del HCMV tiene 2 regiones de transcripción temprana (IE1 e IE2), estas producen 2 proteínas virales conocidas como IE1-72 e IE2-86, estas son importantes en la alteración del ciclo celular activando o bloqueando la progresión del ciclo celular en ausencia de otras proteínas virales. Ensayos *in vitro* han demostrado que IE1-72 induce la acumulación nuclear de p53, mientras que IE2-82 es un transactivador de los genes tempranos del HCMV, además que se une a RB y p53 (Spector, 2015). Además, otra proteína de interés es la Glicoproteína B, esta tiene un papel importante en la entrada y fusión del virus, se cree que participa en la propagación del virus de célula a célula y se ha propuesto son necesarias para el ensamblaje del virión y su salida de las células infectadas (Isaacson & Compton, 2009). La detección de ADN del CMV en el presente trabajo fue realizada mediante amplificación de un fragmento del gen que codifica para gB debido a su importancia para la infección viral y que su secuencia de nucleótidos se encuentra conservada, además, varias regiones del gen gB se han utilizado como dianas de ensayo de PCR (Britt et al., 2005; Chou & Dennison, 1991; Fox et al., 1992; Guiver et al., 2001; Walter et al., 2008).

La búsqueda del HCMV en pacientes con GBM captó el interés debido a la inflamación crónica y al estado inmunodeprimido de los pacientes, esto sería el entorno perfecto para la reactivación del HCMV en las células tumorales (Rahman et al., 2019). Cobbs y colaboradores en 2002 fueron los primeros en demostrar la presencia del HCMV en pacientes glioma de bajo y alto grado, ellos encontraron que 22 (100%) de 22 muestras que correspondían a GBM fueron positivas (Cobbs et al., 2002). Scheurer y colaboradores en 2008 encontraron resultados similares, reportando un 100% de prevalencia en 21 muestras de GBM (Scheurer et al., 2008). Mientras que Mitchell y colaboradores en 2008 determinaron que 42 (93.3%) de 45 eran positivas (Mitchell et al., 2008). Sin embargo, otros estudios han reportado resultados distintos, Priel y colaboradores en 2015 reportaron un 0% de prevalencia en 7 muestras de GBM y un estudio reciente realizado por García-Martínez y colaboradores en 2017 en donde evaluaron la presencia de HCMV mediante PCR e inmunohistoquímica encontraron un 2.52% de prevalencia en 119 muestras de GBM (García-Martínez et al., 2017; Priel et al., 2015). Los resultados han sido de gran controversia debido a la prevalencia reportada de 0 a 100%. En el presente estudio se reportó un 0% de prevalencia de HCMV en las 62 muestras de GBM analizadas. La prevalencia de 0% concuerda con lo reportado Poltermann y colaboradores en 2006 que determinaron que 0 (0%) de 40 muestras de GBM fueron positivas para el material genético del CMV (Poltermann et al., 2006). La razón de encontrar una prevalencia de 0 a 100% puede ser el uso de distintas técnicas como inmunohistoquímica, hibridación in situ, microscopía electrónica, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) junto con secuenciación de ADN y citometría para detectar proteínas (IE1, US28, pp65, gB, IL-10 y pp28) y ADN (IE1 y gB) del HCMV (Dziurzynski et al., 2012). Recientemente se ha sugerido el uso de un ensayo qPCR duplex para la búsqueda de los genes IE2 y gB podría evitar los falsos negativos, esto se debe a la evidencia de que el gen gB no se encuentra tan conservado como se afirmaba y en algunos estudios los oligonucleótidos y sondas dirigidos al gen IE2 detectaron ADN del CMV pero aquellos dirigidos a gB dieron resultados negativos (Novak et al., 2011).

La proteína de supresión tumoral p53 ha sido descrito como un posible marcador molecular del pronóstico en gliomas, en otros tipos de cáncer como cáncer de endometrio, cáncer de mama, y carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello ya se demostró que se encuentra sobre-expresado. Existen diversos estudios en donde

utilizan distintos puntos de corte para evaluar la expresión positiva de p53, el sistema más utilizado es expresión negativa cuando se encuentran menos del 10% de núcleos teñidos y expresión positiva cuando se tiene 10% o más de núcleos teñidos. Un metaanálisis a partir de 21 estudios de la expresión de p53 en gliomas determinó que se tiene una media de 53.8% de casos positivos (rango de 33.3 a 68.9%) (Jin et al., 2016). Otros estudios han reportado que los porcentajes de expresión van desde 0 hasta un 90% de núcleos teñidos, además de utilizar un punto de corte de igual o mayor a 10% de núcleos teñidos como expresión positiva, encontrando que 27 (66%) de 41 casos fueron positivos a la expresión y 14 (34%) de 41 fueron negativos (Roshandel et al., 2019). Nuestros resultados concuerdan con lo reportado encontrando un rango de expresión de 0 a 90%, además de 40 (70.2%) de 57 casos evaluados fueron positivos para la expresión, mientras que 17 (29.8%) tuvieron una expresión menor a 10%. Un estudio reportó que los pacientes con GBM menores de 45 años que tienen una sobreexpresión de p53 tuvieron una mejor supervivencia comparado con aquellos mayores de 45 años ($p=0.011$) (Chaurasia et al., 2016), no encontramos una diferencia significativa entre la expresión de p53 y el rango de edad de >65 años ($p=0.553$). Además, Chaurasia en 2016 también reportó que no existió una diferencia significativa en el análisis de Kaplan-Meier ($p=0.056$), sin embargo, este valor puede ser tomado como una diferencia significativa marginal al encontrarse en un rango $p>0.05$ y <0.1 , nuestros hallazgos son similares al observar una ligera disminución en la supervivencia de los pacientes con expresión negativa a p53 ($p=0.093$) (**Figura 16**). La mayoría de los casos evaluados correspondieron a hombres sin expresión de p53 con 24 (72.2%), sin embargo, la expresión de p53 no se encuentra relacionada con el género ($p=0.771$), concuerda con lo reportado por Jin en 2016 donde encontraron un valor de p de 0.60 (Jin et al., 2016). Nuestros resultados indican que el tratamiento aplicado y la resección quirúrgica correlacionado con la expresión de los 57 casos no tiene una diferencia significativa ($p>0.05$), esto está respaldado por Pardo y colaboradores en 2004 donde determinaron que el uso de quimioterapia, radioterapias y el tipo de resección quirúrgica no tiene una diferencia significativa ($p>0.05$). El valor de ECOG no ha sido correlacionado con la expresión de p53, sin embargo, se ha reportado que la escala de Karnofsky (similar a la escala ECOG) tiene una significancia estadística ($p=0.009$), sin embargo la escala de ECOG no tiene un valor estadístico ($p=0.338$) (Pardo et al., 2004). (**Tabla 7**).

Para los 40 casos con expresión positiva de p53 ($\geq 10\%$ de núcleos teñidos) se utilizó la escala más utilizada para evaluar la expresión, de 10-25% de núcleos teñidos se clasificó como expresión baja, 26-50% expresión moderada y $\geq 50\%$ fue clasificado como expresión alta (Jin et al., 2016). En este estudio se encontraron 18 (45.0%) de expresión baja, 11 (27.5%) de expresión moderada y 11 (27.5%). Muchos estudios realizados en glioblastomas clasifican la expresión de forma similar, sin embargo, solamente reportan expresión negativa y positiva, un estudio en cáncer colorrectal encontró que 68 (13.7%) de 498 casos positivos correspondieron a expresión baja, 110 (22.1%) expresión moderada y 320 (64.3%) expresión alta (Oh et al., 2019). A diferencia de la correlación de la expresión y el tratamiento aplicado donde no se encontró una diferencia significativa, la correlación entre los grupos de expresión positiva con el tratamiento recibido no fue significativo ($p=0.418$), y en este caso, la supervivencia tuvo una diferencia significativa entre los grupos de expresión baja, moderada y alta ($p=0.037$) (**Tabla 8**). La supervivencia a 12 meses de los 40 pacientes no fue estadísticamente significativa ($p=0.418$) (**Figura 16**), mientras que al correlacionar la expresión negativa y positiva con la supervivencia se obtuvo una diferencia significativa marginal ($p=0.093$) (**Figura 17**).

Se ha reportado que la metilación en el promotor de los genes puede regular su expresión, el caso más claro es el del gen MGMT que ya ha sido ampliamente estudiado en pacientes con GBM, la metilación del promotor de dicho gen puede ser un indicador una mejor respuesta al tratamiento con temozolamida (Feldheim et al., 2019). En cáncer, la proteína de supresión tumoral p53 se encuentra des-regulada, teniendo un rango de expresión de 0-90%, siendo que normalmente su expresión debe ser del 10% o menos, se ha reportado que aproximadamente un 80% de los casos de pacientes sanos poseen una expresión negativa de p53 (Idikio, 2011). El gen TP53 se encuentra mutado en un 30-70% de los casos de GBM y las mutaciones de ganancia de función se encuentran ampliamente relacionadas con la sobreexpresión de p53 provocando que p53 tenga funciones que ayudan a la progresión tumoral (Lee et al., 2020). Sin embargo, son muy pocos los estudios enfocados en las metilaciones del promotor del gen TP53, en adenocarcinoma se ha encontrado en el 18% de los casos evaluados y comparado con la expresión de p53 no se encontró una diferencia significativa ($p=0.152$) (Yatagai et al., 2019). En glioblastoma no se ha aclarado si las metilaciones en el promotor de TP53 se asocia con la reducción de la expresión

transcripcional o traduccional. Un estudio realizado en 42 casos de GBM reportó que solamente en 9 (21.4%) se encontraron metilados (Jesionek-Kupnicka et al., 2014). Nuestros resultados no concuerdan con lo reportado en otros tipos de cáncer y en GBM, de los 41 casos evaluados se encontró 21 (51.2%) metilados y 20 (48.2%) no metilados. También se buscó la correlación entre la expresión de p53 y la metilación del promotor de TP53 y no se encontró diferencia significativa ($p=0.787$), similar a lo encontrado en nuestro estudio ($p=1.000$) (**Tabla 10**). En el caso de las metilaciones se encontró una diferencia significativa en la correlación de la edad ($p=0.050$) y ≥ 65 años de edad ($p=0.039$), con el resto de características clínico histopatológicas no se encontró diferencia significativa ($p>0.05$) (**Tabla 9**).

8 CONCLUSION

- Se determino un 0% de prevalencia de la infección de Citomegalovirus en muestras de pacientes con Glioblastoma Multiforme.
- De los 57 casos que se evaluó la expresión se encontraron 17 (29.8%) casos con expresión negativa y 40 (70.2%) positivos.
- En pacientes con una supervivencia ≥ 12 meses se encontró una diferencia significativa marginal ($p=0.083$).
- La supervivencia en pacientes con expresión negativa fue menor comparado con aquellos con expresión positiva, se encontró una diferencia significativa marginal ($p=0.093$), mientras que, el análisis de Kaplan-Meier con los grupos de expresión positiva se observó una ligera disminución de la supervivencia en los casos con expresión alta comparada con los grupos de expresión baja y moderada, sin embargo, no hubo diferencia significativa ($p=0.418$).
- Se encontró una diferencia significativa comparando la resección quirúrgica ($p=0.021$) y el tratamiento recibido ($p=0.037$) con los grupos de expresión positiva (baja, moderada y alta).
- Se determino el estado de metilación de 41 especímenes, 21 (51.2%) casos metilados y 20 (48.2%) no metilados. Se encontró diferencia significativa en la edad ($p=0.050$) y en los pacientes mayores de 65 años ($p=0.039$).
- No existe relación entre las metilaciones en el promotor TP53 y la expresión de p53 ($p=1.000$).

9 PERSPECTIVAS

- Evaluar la prevalencia del Citomegalovirus en muestras de pacientes de GBM por distintas técnicas como detección de la proteína por qPCR duplex (genes IE1, IE2 y gB), inmunohistoquímica dirigida a la proteína IE1, PCR anidada, secuenciación o hibridación *in situ*, esto debido a las distinta sensibilidad y especificidad.
- Realizar secuenciación dirigida a genes que funcionan como marcadores moleculares en GBM y determinar si las mutaciones están relacionadas con la sobrevida a 12 meses de los pacientes.
- Secuenciar el gen TP53 y correlacionar el tipo de mutaciones con la expresión de la proteína p53, debido a los altos costos de secuenciación se busca que por pruebas de inmunohistoquímica se podría determinar el tipo de mutación que podría poseer el genoma del paciente.

10 BIBLIOGRAFÍA

- Abe H, Natsumeda M, Kanemaru Y, Watanabe J, Tsukamoto Y, Okada M, et al. 2018. MGMT expression contributes to temozolomide resistance in H3K27M-Mutant diffuse midline gliomas and MGMT silencing to temozolomide sensitivity in IDH-mutant gliomas. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 58(7):290–5.
- Afshar RM, Mollaei HR, Zandi B, Iranpour M. 2016. Evaluation of JC and cytomegaloviruses in glioblastoma tissue. *Asian Pacific J Cancer Prev*.17(11):4907–11.
- Agirre X, Novo FJ, Calasanz MJ, Larráyoz MJ, Lahortiga I, Valgañón M, et al. 2003. TP53 Is Frequently Altered by Methylation, Mutation, and/or Deletion in Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Mol Carcinog*. 38(4):201–8.
- Amatya VJ, Naumann U, Weller M, Ohgaki H. 2005. TP53 promoter methylation in human gliomas. *Acta Neuropathol*. 110(2):178–84.
- Anaya-Delgadillo G, de Juambelz-Cisneros PP, Fernández-Alvarado B, Pazos-Gómez F, Velasco-Torre A, Revuelta-Gutiérrez R. 2016. Prevalence of central nervous system tumours and histological identification in the operated patient: 20 years of experience. *Cirugía y Cir (English Ed)*. 84(6):447–53.
- Britt WJ, Jarvis MA, Drummond DD, Mach M. 2005. Antigenic Domain 1 Is Required for Oligomerization of Human Cytomegalovirus Glycoprotein B. *J Virol*. 79(7):4066–79.
- Chaurasia A, Park SH, Seo JW, Park CK. 2016. Immunohistochemical analysis of ATRX, IDH1 and p53 in glioblastoma and their correlations with patient survival. *J Korean Med Sci*. 31(8):1208–14.
- Chen L, Zou X, Wang Y, Mao Y, Zhou L. 2013. Central nervous system tumors: A single center pathology review of 34,140 cases over 60 years. *BMC Clin Pathol*. 13(1).
- Chou S, Dennison KM. 1991. Analysis of interstrain variation in cytomegalovirus glycoprotein B sequences encoding neutralization-related epitopes. *J Infect Dis*. 163(6):1229–34.
- Cobbs CS, Harkins L, Samanta M, Gillespie GY, Bharara S, King PH, et al. 2002. Human cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma. *Cancer Res*. 62(12):3347–50.

- Cruz P, Acevedo F. 2014. Escalas de estado funcional (o performance status) en cáncer. *Gastroenterol latinoam.* 25(3):219-226.
- Dobes P, Podhorec J, Coufal O, Jureckova A, Petrakova K, Vojtesek B, et al. 2014. Influence of mutation type on prognostic and predictive values of TP53 status in primary breast cancer patients. *Oncol Rep.* 32(4):1695–702.
- Dziurzynski K, Chang SM, Heimberger AB, Kalejta RF, Dallas SRMG, Smit M, et al. 2012. Consensus on the role of human cytomegalovirus in glioblastoma. *Neuro Oncol.* 14(3):246–55.
- Feldheim J, Kessler AF, Monoranu CM, Ernestus RI, Löhr M, Hagemann C. 2019. Changes of o6-methylguanine dna methyltransferase (Mgmt) promoter methylation in glioblastoma relapse—a meta-analysis type literature review. *Cancers (Basel).* 11(12).
- Fox JC, Griffiths PD, Emery VC. 1992. Quantification of human cytomegalovirus DNA using the polymerase chain reaction. *J Gen Virol.* 73(9):2405–8.
- Garcia-Martinez A, Alenda C, Irlas E, Ochoa E, Quintanar T, Rodriguez-Lescure A, et al. 2017. Lack of cytomegalovirus detection in human glioma. *Virol J.* 14(1):14–7.
- Grech N, Dalli T, Mizzi S, Meilak L, Calleja N, Zrinzo A. 2020. Rising Incidence of Glioblastoma Multiforme in a Well-Defined Population. *Cureus.* 12(5).
- Guiver M, Fox AJ, Mutton K, Mogulkoc N, Egan J. 2001. Evaluation of CMV viral load using TaqMan CMV quantitative PCR and comparison with CMV antigenemia in heart and lung transplant recipients. *Transplantation.* 71(11):1609-1615.
- Hanif F, Muzaffar K, Perveen K, Malhi SM, Simjee SU. 2017. Glioblastoma multiforme: A review of its epidemiology and pathogenesis through clinical presentation and treatment. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 18(1):3–9.
- Herbein G. 2018. The human cytomegalovirus, from oncomodulation to oncogenesis. *Viruses.* 10(8):1–16.
- Idikio HA. Quantitative analysis of p53 expression in human normal and cancer tissue microarray with global normalization method. *Int J Clin Exp Pathol.* 2011;4(5):505-512.
- Isaacson MK, Compton T. 2009. Human Cytomegalovirus Glycoprotein B Is Required

for Virus Entry and Cell-to-Cell Spread but Not for Virion Attachment, Assembly, or Egress. *J Virol.* 83(8):3891–903.

Jesionek-Kupnicka D, Szybka M, Malachowska B, Fendler W, Potemski P, Piaskowski S, et al. 2014. TP53 promoter methylation in primary glioblastoma: Relationship with TP53 mRNA and protein expression and mutation status. *DNA Cell Biol.* 33(4):217–26.

Jin Y, Xiao W, Song T, Feng G, Dai Z. 2016. Expression and Prognostic Significance of p53 in Glioma Patients: A Meta-analysis. *Neurochem Res.* 41(7):1723-1731. doi:10.1007/s11064-016-1888-y

Klughammer J, Kiesel B, Roetzer T, Fortelny N, Nemeš A, Nennig KH, et al. 2018. The DNA methylation landscape of glioblastoma disease progression shows extensive heterogeneity in time and space. *Nat Med.* 24(10):1611–24.

Krex D, Klink B, Hartmann C, Von Deimling A, Pietsch T, Simon M, et al. 2007. Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain.* 130(10):2596–606.

Landolfo S, Gariglio M, Gribaudo G, Lembo D. 2003. The human cytomegalovirus. *Pharmacol Ther.* 98(3):269–97.

Larjavaara S, Mäntylä R, Salminen T, Haapasalo H, Raitanen J, Jääskeläinen J, et al. 2007. Incidence of gliomas by anatomic location. *Neuro Oncol.* 9(3):319–25.

Lee J, Park SH, Kim YZ. Prognostic Evaluation of Neurological Assessment of the Neuro-Oncology Scale in Glioblastoma Patients. *Brain Tumor Res Treat.* 2018;6(1):22. doi:10.14791/btrt.2018.6.e1

Lee YJ, Seo HW, Baek JH, Lim SH, Hwang SG, Kim EH. Gene expression profiling of glioblastoma cell lines depending on TP53 status after tumor-treating fields (TTFields) treatment. *Sci Rep.* 2020;10(1):1-14. doi:10.1038/s41598-020-68473-6

Louis DN, Holland EC, Cairncross JG. 2001. Glioma classification: A molecular reappraisal. *Am J Pathol.* 159(3):779–86.

Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. 2016. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 131(6):803–20.

- Ludwig K, Kornblum HI. 2017 Molecular markers in glioma. *J Neurooncol.* 134(3):505–12.
- Michaelis M, Doerr HW, Cinatl J. 2009. The story of human cytomegalovirus and cancer: Increasing evidence and open questions. *Neoplasia.* 11(1):1–9.
- Mitchell DA, Xie W, Schmittling R, Learn C, Friedman A, McLendon RE, et al. 2008. Sensitive detection of human cytomegalovirus in tumors and peripheral blood of patients diagnosed with glioblastoma. *Neuro Oncol.* 10(1):10–8.
- Murnyák B, Hortobágyi T. 2016 Immunohistochemical correlates of TP53 somatic mutations in cancer. *Oncotarget.* 7(40):64910–20.
- Nelson JS, Burchfiel CM, Fekedulegn D, Andrew ME. 2012. Potential risk factors for incident glioblastoma multiforme: The Honolulu Heart Program and Honolulu-Asia Aging Study. *J Neurooncol.* 109(2):315–21.
- Novak Z, Chowdhury N, Ross SA, Pati SK, Fowler K, Boppana SB. 2011. Diagnostic consequences of cytomegalovirus glycoprotein B polymorphisms. *J Clin Microbiol.*;49(8):3033–5.
- Pardo FS, Hsu DW, Zeheb R, Efird JT, Okunieff PG, Malkin DM. 2004. Mutant, wild type, or overall p53 expression: Freedom from clinical progression in tumours of astrocytic lineage. *Br J Cancer.* 91(9):1678–1686. doi:10.1038/sj.bjc.6602161
- Pawlowska E, Szczepanska J, Szatkowska M, Blasiak J. 2018. An interplay between senescence, apoptosis and autophagy in glioblastoma multiforme—role in pathogenesis and therapeutic perspective. *Int J Mol Sci.* 19(3).
- Poltermann S, Schlehofer B, Steindorf K, Schnitzler P, Geletneky K, Schlehofer JR. 2006. Lack of association of herpesviruses with brain tumors. *J Neurovirol.* 12(2):90–9.
- Priel E, Wohl A, Teperberg M, Nass D, Cohen ZR. 2015. Human cytomegalovirus viral load in tumor and peripheral blood samples of patients with malignant gliomas. *J Clin Neurosci* [Internet]. 22(2):326–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jocn.2014.06.099>
- Rahman M, Dastmalchi F, Karachi A, Mitchell D. 2019. The role of CMV in glioblastoma and implications for immunotherapeutic strategies. *Oncoimmunology.*

8(1):1–8. Available from: <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1514921>

Robles AI, Harris CC. 2010. Clinical outcomes and correlates of TP53 mutations and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2(3):1–15.

Rodríguez R, Lombardo K, Roldán G, Silvera J, Lagomarsino R. 2012. Glioblastoma multiforme cerebral hemisférico: análisis de sobrevida de 65 casos tratados en el Departamento de Oncología del Hospital de Clínicas, desde 1980 a 2000. *Rev Médica del Uruguay.* 28(4):250–61.

Roshandel AK, Busch CM, Van Mullekom J, et al. 2019. The predictive capability of immunohistochemistry and DNA sequencing for determining TP53 functional mutation status: A comparative study of 41 glioblastoma patients. *Oncotarget.* 10(58):6204-6218. doi:10.18632/oncotarget.27252

Roy S, Lahiri D, Maji T, Biswas J. 2015. Recurrent Glioblastoma: Where we stand [retracted in: *South Asian J Cancer.* 2017 Oct-Dec;6(4):153]. *South Asian J Cancer.* 4(4):163-173. doi:10.4103/2278-330X.175953

Saeed WH, Eissa AA, Al-Doski AA. 2019. Impact of TP53 gene promoter methylation on chronic lymphocytic leukemia pathogenesis and progression. *J Blood Med.* 10:399-404. doi:10.2147/JBM.S221707

Scheurer ME, Bondy ML, Aldape KD, Albrecht T, El-Zein R. 2008. Detection Of Human Cytomegalovirus In Different Histological Types Of Gliomas. *Acta Neuropathol.* 116(1):79–86.

Schlomm T, Iwers L, Kirstein P, Jessen B, Köllermann J, Minner S, et al. 2008. Clinical significance of p53 alterations in surgically treated prostate cancers. *Mod Pathol.* 21(11):1371–8.

Schwartzbaum JA, Fisher JL, Aldape KD, Wrensch M. 2006. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat Clin Pract Neurol.* 2(9):494–503.

Shaw PH. 1996. The role of p53 in cell cycle regulation. *Pathol Res Pract* [Internet]. 192(7):669–75. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0344-0338\(96\)80088-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0344-0338(96)80088-4)

Sidhu S, Martin E, Gicquel C, Melki J, Clark SJ, Campbell P, et al. 2005. Mutation and methylation analysis of TP53 in adrenal carcinogenesis. *Eur J Surg Oncol.* 31(5):549–54.

Slobedman B, Stern JL, Cunningham AL, Abendroth A, Abate DA, Mocarski ES. 2004. Impact of Human Cytomegalovirus Latent Infection on Myeloid Progenitor Cell Gene Expression. *J Virol*. 78(8):4054–62.

Spector DH. 2015. Human cytomegalovirus riding the cell cycle. *Med Microbiol Immunol* [Internet]. 204(3):409–19. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00430-015-0396-z>

Tamimi AF, Juweid M. Epidemiología y resultado del glioblastoma. En: De Vleeschouwer S, editor. *Glioblastoma* [Internet]. Brisbane (AU): Publicaciones Codon; 27 de septiembre de 2017. Capítulo 8. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470003/> doi: 10.15586 / codon.glioblastoma.2017.ch8

Tomtishen J. 2012. Human cytomegalovirus tegument proteins (pp65, pp71, pp150, pp28). *Virol J* [Internet]. 9(1):22.

Villà S, Balaña C, Comas S. 2014. Radiation and concomitant chemotherapy for patients with glioblastoma multiforme. *Chin J Cancer*. 33(1):25–31.

Walter S, Atkinson C, Sharland M, Rice P, Raglan E, Emery VC, et al. 2008. Congenital cytomegalovirus: Association between dried blood spot viral load and hearing loss. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 93(4).

Wang YC, Wang NC, Lin JC, Perng CL, Yeh KM, Yang YS, et al. 2011. Risk factors and outcomes of cytomegalovirus viremia in cancer patients: A study from a medical center in northern Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* [Internet]. 44(6):442–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmii.2011.04.004>

Yatagai N, Saito T, Akazawa Y, et al. TP53 inactivation and expression of methylation-associated proteins in gastric adenocarcinoma with enteroblastic differentiation. *Virchows Arch*. 2019;474(3):315-324. doi:10.1007/s00428-018-2508-9

Zhang C, Liu J, Xu D, Zhang T, Hu W, Feng Z. 2020. Gain-of-function mutant p53 in cancer progression and therapy. *J Mol Cell Biol*. 12(9):674–87.

Zhang Y, Dube C, Gibert M, Cruickshanks N, Wang B, Coughlan M, et al. 2018. The p53 pathway in glioblastoma. *Cancers (Basel)*. 10(9).

