

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



PREVALENCIA DEL VEB Y ANÁLISIS DEL PERFIL DE METILACIONES DEL PROMOTOR DE P16^{INK4A} Y SU EXPRESIÓN EN GLIOBLASTOMA MULTIFORME DE PACIENTES DE UNA UNIDAD MÉDICA DE TERCER NIVEL DEL NORESTE DE MÉXICO.

Por

L. B. G. ALONDRA YAMILETH ALANIS VALDEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA

2021

PREVALENCIA DEL VEB Y ANÁLISIS DEL PERFIL DE METILACIONES DEL
PROMOTOR DE P16^{INK4A} Y SU EXPRESIÓN EN GLIOBLASTOMA
MULTIFORME DE PACIENTES DE UNA UNIDAD MÉDICA DE TERCER NIVEL
DEL NORESTE DE MÉXICO.

Comité de Tesis



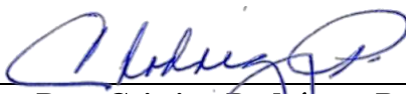
Dr. José Manuel Vázquez Guillén

Presidente



Dra. Vianey González Villasana

Secretario



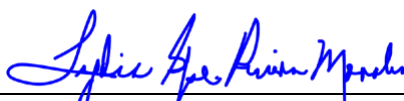
Dra. Cristina Rodríguez Padilla

Vocal



Dra. Ana Carolina Martínez Torres

Vocal



Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales

Vocal



Dra. Katiushka Arévalo Niño

Subdirectora de Posgrado



SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO

PREVALENCIA DEL VEB Y ANÁLISIS DEL PERFIL DE METILACIONES DEL
PROMOTOR DE P16^{INK4A} Y SU EXPRESIÓN EN GLIOBLASTOMA MULTIFORME
DE PACIENTES DE UNA UNIDAD MÉDICA DE TERCER NIVEL DEL NORESTE
DE MÉXICO.

Dirección de tesis



Dr. José Manuel Vázquez Guillén

Director



Dr. Gerardo del Carmen 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 contó con el financiamiento parcial del Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT) de la Secretaría de Investigación y Desarrollo Tecnológico de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

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

ASESORÍA ESPECIALIZADA

Para la realización del presente trabajo se contó con la colaboración y asesoría especializada en otorrinolaringología y anatomopatología de:

- Dr. Ángel Zavala Pompa¹
- Q.C.B Silvia Margarita García Herrera¹
- Q.F.B. Adriana Isabel Gallardo Gómez¹

¹Medicina Diagnostica S.A. de C.V. Servicios Integrales de Análisis Clínicos, Citopatología, Anatomía Patológica y Oncología Diagnóstica. Av. Simón Bolívar 1333, Colonia Mitras Centro, Monterrey, N. L., CP 64460, México.

AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Cristina Rodríguez Padilla** por las oportunidades que a través del **Laboratorio de Inmunología y Virología** me brindaron y me ayudaron a crecer como estudiante durante mi formación académica.

Al **Dr. José Manuel Vázquez Guillén** por el asesoramiento, la dirección académica y el gran apoyo brindado durante el desarrollo de este proyecto de tesis y en general en mi formación como estudiante.

Al **Dr. Gerardo C. Palacios Saucedo** de la UMAE No. 25 del IMSS por su colaboración, orientación, aportaciones y observaciones en el análisis y desarrollo del proyecto de tesis.

A la **Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales** por sus palabras de aliento, recibirme en su laboratorio, su apoyo en asesoría y revisión de este trabajo.

A la **Dra. Ana Carolina Martínez Torres** por la colaboración y revisión de este trabajo de tesis.

A la **Dra. Vianey González Villasana** por la colaboración y revisión de este trabajo de tesis.

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 **Quim. Silvia García** por su apoyo, su conocimientos impartidos y la paciencia en su enseñanza.

A el **L.B.G. Aldo Sebastian Flores Flores** por su apoyo en la realización del trabajo experimental de este proyecto.

A mis compañeros del **Laboratorio de Inmunología y Virología** que de alguna manera contribuyeron a la realización de este proyecto.

Para Gesabel Yasmin Alanis Valdes

Gracias por guiarme, cuidarme, y amarme durante toda mi vida. Fuiste y siempre serás una parte importante en ella. Gracias por ser mi tía, mi mamá, mi hermana, y mi amiga. Gracias por preocuparte por mí siempre, y aconsejarme cuando lo necesitaba. Gracias por siempre sacarme una sonrisa, aun en los peores días. Agradezco infinitamente a la vida por permitirme coincidir contigo.

Te amo demasiado y te extraño mucho.

DEDICATORIA

A mis padres Brenda Yadira Alanis Valdez y Ángel Guadalupe Garza Merza. Por todo el amor y apoyo incondicional que me brindaron a lo largo de esta etapa y a lo largo de la vida. Por el sacrificio, esfuerzo y trabajo que hicieron para lograr culminar mi maestría, por siempre creer en mí y alentarme a seguir adelante y enseñarme que con mucho esfuerzo y dedicación todo se puede lograr.

A mi mamá Martha Irene Valdez Salazar, por todo su cariño, amor y comprensión, por siempre apoyarme y confiar en mis decisiones y siempre alentarme a que puedo cumplir mis objetivos, por todos los buenos consejos que me ha dado a lo largo de mi vida.

A toda familia, por todo su cariño y sus bendiciones. Por que a pesar de todo lo que hemos pasado juntos seguimos adelante, y por que gracias a ustedes puedo salir adelante. Por todo su apoyo y creer en mí. Los amo mucho.

A mi maestro José Manuel Vázquez Guillén, por su amistad, por el apoyo incondicional y enseñanzas en lo que llevamos de conocernos. Por siempre guiarme y aconsejarme cada vez que lo necesitaba, y además por hacerme los días en el laboratorio lo más divertido posible.

A Erick, por el amor y cariño, y siempre alentarme a que podía lograr cualquier cosa que me propusiera, por estar a mi lado en las buenas y en las malas, y por hacer que mis días sean los mejores.

A mis amigos y compañeros del laboratorio, Aldo y Alonso, por la compañía, apoyo y sobre todo por las risas y momentos compartidos, por que con ustedes en el laboratorio mis días son mas divertidos.

ÍNDICE

INDICE DE TABLAS.....	2
INDICE DE FIGURAS.....	3
LISTA DE ABREVIATURAS.....	4
RESUMEN.....	5
ABSTRACT.....	6
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1 Sistema nervioso central.....	2
2.2 Tumores del sistema nervioso central.....	2
2.3 Glioblastoma multiforme.....	3
2.4 Epidemiología.....	3
2.5 Manifestaciones clínicas.....	4
2.6 Características macroscópicas e histopatológicas.....	4
2.7 Factores de riesgo.....	6
2.7.1 Virus de Epstein-Barr.....	7
2.7.2 Glioblastoma multiforme e infección por Virus de Epstein-Barr.....	8
2.7.3 Proteína de supresión tumoral p16 ^{INK4a}	9
2.7.4 Metilación en región promotora de p16 ^{INK4a}	10
2.7.5 Glioblastoma multiforme y p16 ^{INK4a}	11
3. JUSTIFICACIÓN.....	13
4. HIPÓTESIS.....	14
5. OBJETIVOS.....	15
5.1 Objetivo general.....	15
5.2 Objetivos específicos.....	15
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	16
6.1 Diseño del Estudio.....	16
6.2 Conjunción del grupo de estudio.....	16
6.3 Extracción de ADN.....	16
6.4 Detección del VEB mediante qPCR.....	17
6.5 Evaluación de la expresión de p16 ^{INK4a} mediante inmunohistoquímica.....	18
6.6 Perfil de metilaciones en promotor de p16 ^{INK4a}	19
6.7 Análisis estadístico.....	21
7. RESULTADOS.....	22

7.1 Población en estudio y análisis de los casos.....	22
7.2 Detección del Virus de Epstein-Barr en glioblastoma multiforme.....	24
7.3 Evaluación de la expresión de p16 ^{INK4a} en glioblastoma multiforme.....	24
7.4 Evaluación de la expresión de p16 ^{INK4a} con respecto a las características clínico-histopatológicas de los pacientes con GBM.	29
7.5 Analisis de los niveles de expresión positiva de p16 ^{INK4a} con respecto a las características clínico-histopatológicas de los pacientes.	31
7.6 Analisis de supervivencia con respecto a la expresión de p16 ^{INK4a} en glioblastoma multiforme.....	33
7.7 Evaluación del perfil de metilaciones en el promotor de p16 ^{INK4a} con respecto a las características clinico-histopatologica de pacientes con GBM.	34
7.8 Analisis de supervivencia con respecto al estado de metilación de p16 ^{INK4a} en glioblastoma multiforme.....	36
7.9 Análisis del estado de metilación del promotor en GBM y la expresión de p16 ^{INK4a}	36
8. DISCUSIÓN	38
9. CONCLUSIÓN.....	43
10. PERSPECTIVAS.....	44
11. BIBLIOGRAFÍA	45

INDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de la region LMP2 del VEB.	14
2	Programa de amplificación	15
3	Oligonucleótidos empleados para amplificar la región promotora del gen p16 ^{INK4a} mediante MSP.....	17
4	Características clínico-histopatológicas de 61 pacientes con GBM.....	23
5	Evaluación de la expresión de p16 ^{INK4a} con respecto a las características clínico-histopatológicas de 58 pacientes con GBM.....	30
6	Características clínico-histopatológicas y niveles de expresión de p16 ^{INK4a} en 58 pacientes con GBM.	32
7	Características clínico-histopatológicas y estado de metilación de p16 ^{INK4a} en 48 pacientes con GBM.	35

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Características celulares y morfológicos de glioblastoma multiforme (HyE).....	5
2. Representación esquemática de la organización del genoma de ADN circular del virus de Epstein-Barr.....	7
3. Secuencia del bloque de ADN sintético diseñado para emplearse como control positivo de amplificación de LMP2 del VEB.....	14
4. Tinción de hematoxilina y eosina de tejido cerebral con diagnóstico de glioblastoma multiforme.....	19
5. Curvas de amplificación.	24
6. Tinción IHQ para p16 ^{INK4a} en GBM del paciente No. 40.....	25
7. Tinción IHQ para p16 ^{INK4a} en GBM del paciente No. 58.....	26
8. Tinción IHQ para p16 ^{INK4a} en GBM del paciente No. 18.....	27
9. Tinción IHQ para p16 ^{INK4a} en GBM del paciente No. 17.	28
10. Análisis de supervivencia a 15 meses con respecto a la expresión de p16 ^{INK4a} en pacientes con GBM.....	33
11. Análisis de supervivencia a 15 meses con respecto al estado de metilación del promotor de p16 ^{INK4a} en pacientes con GBM.....	

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
CMV	Citomegalovirus
DAB	3,3'-Diaminobencidina
EBNA2	Antígeno nuclear 2 de Epstein-Barr
EBNA3A	Antígeno nuclear 3A de Epstein-Barr
EBNA3C	Antígeno nuclear 3C de Epstein-Barr
EBNA-LP	Antígeno nuclear LP de Epstein-Barr
FFyEP	Fijados en formol y embebidos en parafina
GBM	Glioblastoma Multiforme
HyE	Hematoxilina y eosina
IHQ	Inmunohistoquímica
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
LMP1	Proteína de membrana latente 1
LMP2A	Proteína de membrana latente 2 ^a
LMP2B	Proteína de membrana latente 2B
nm	Nanómetro
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
pRB	Proteína de retinoblastoma
SCN	Sistema nervioso central
VEB	Virus de Epstein-Barr
VPH	Virus del Papiloma Humano
μL	Microlitros

RESUMEN

El glioblastoma multiforme (GBM) es el glioma difuso más agresivo y es el tumor maligno primario del sistema nervioso central (SNC) más común y de peor pronóstico, ya que solo un 33% de los pacientes sobreviven más de un año mientras que menos del 5% logran vivir más de 5 años. La causa específica del GBM aún es desconocida, sin embargo, se ha puesto cada vez más énfasis en una etiología viral. El Virus de Epstein-Barr (VEB) ha sido ampliamente asociado con el desarrollo de tumores en humanos y, mientras algunos estudios lo han reportado en GBM con una prevalencia del 90% de los casos, existen otros que no lo han detectado, por lo que una asociación entre el VEB y GBM aún es controversial. Además, existen mutaciones y anomalías genéticas que pueden conducir a la gliomagenesis; se ha visto, por ejemplo, que la delección/mutación de p16^{INK4a} puede contribuir al desarrollo de GBM por lo que la causa molecular exacta de GBM es aún difícil de descifrar. El objetivo de la presente tesis fue evaluar la prevalencia del virus de Epstein-Barr y el estado de metilación de la región promotora de p16^{INK4a} y su expresión en glioblastoma multiforme de pacientes de una unidad médica de tercer nivel del noreste de México. Un total de 61 tumores cerebrales en formalina y embebidos en parafina (FFyEP) con diagnóstico de glioblastoma multiforme conformaron el estudio. Se encontró una prevalencia del 0.0% del Virus de Epstein-Barr. La expresión de p16^{INK4a} fue positiva en 49/58 (84.5%) GBM. Sin embargo, no se encontró alguna diferencia estadísticamente significativa entre la expresión de p16^{INK4a} y las características clínico-histopatológicas y la supervivencia de los pacientes ($p < 0.05$). La metilación del promotor de p16^{INK4a} se presentó en 26/48 (54.2%) casos de GBM. No se encontró diferencia significativa entre el estado de metilación de p16^{INK4a} y las características clínico-histopatológicas, sin embargo, sí entre el estado de metilación y la supervivencia ($p < 0.05$). Se encontró una diferencia significativa entre la expresión de p16^{INK4a} y el estado de metilación del promotor de p16^{INK4a} ($p < 0.05$).

ABSTRACT

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most aggressive diffuse glioma and common primary malignant tumor of the central nervous system (CNS) with the worst prognosis, only 33% of patients survive more than a year while fewer 5% manage to live more than 5 years. The specific cause of GBM is unknown, however, increasing emphasis has been placed on a viral etiology. The Epstein-Barr Virus (EBV) has been widely associated with the development of tumors in humans and, while some studies have reported it in GBM with a prevalence of 90% of cases, there are others that have not detected it, therefore that an association between the VEB and the GBM is still controversial. In addition, there are genetic mutations and abnormalities that can lead to gliomagenesis; It has been seen, for example, that the deletion/mutation of p16^{INK4a} can contribute to the development of GBM so that the exact molecular cause of GBM is still difficult to decipher. The aim of this thesis was to evaluate the prevalence of the Epstein-Barr virus and the methylation status of the promoter region of p16^{INK4a} and its expression in glioblastoma multiforme patients of a medical unit tertiary northeast Mexico. A total of 61 formalin fixed and paraffin-embedded (FFPE) brain tumors with a diagnosis of glioblastoma multiforme made up the study. A prevalence of 0.0% of the Epstein-Barr virus was found. The expression of p16^{INK4a} was positive in 49/58 (84.5%) GBM. However, no statistically significant difference was found between the expression of p16^{INK4a} and the clinical-histopathological characteristics and survival of the patients ($p < 0.05$). Promoter methylation of p16^{INK4a} occurred in 26/48 (54.2%) GBM cases. No significant difference was found between the methylation status of p16^{INK4a} and the clinical-histopathological characteristics, however, there was between the methylation status and survival ($p < 0.05$). A significant difference was found between the expression of p16^{INK4a} and the methylation status of the p16^{INK4a} promoter ($p < 0.05$).

1. INTRODUCCIÓN.

El glioblastoma multiforme (GBM) es el glioma difuso más agresivo del linaje astrocítico y el tumor maligno primario del sistema nervioso central (SNC) más común y de peor pronóstico, ya que solo un 33% de los pacientes sobreviven más de un año mientras que menos del 5% logran vivir más de 5 años (Castañeda et al., 2015; De Vleeschouwer, 2017). Ocurre tanto en hombres como en mujeres y la incidencia es mayor en asiáticos, latinos y blancos (Porter, 2012). La causa específica del GBM es desconocida e identificar diversos factores de riesgo ha resultado difícil (Porter, 2012). Actualmente no se ha encontrado una asociación concluyente entre esta patología y factores ambientales como el tabaquismo, lesiones graves en la cabeza, factores de riesgo ocupacional (Hanif et al., 2017). Se ha puesto cada vez más énfasis en una etiología viral, el Virus de Epstein-Barr (VEB) ha sido ampliamente asociado con el desarrollo de tumores en humanos y, mientras algunos estudios lo han reportado en GBM con una prevalencia del 90% de los casos, existen otros que no lo han detectado, por lo que una asociación entre el VEB y GBM aún es controversial (Akhtar et al., 2018). Además, existen mutaciones y anomalías genéticas que pueden conducir a la gliomagenesis, hay evidencia que apuntan que el supresor de tumores y regulador del ciclo celular $p16^{INK4a}$ tiene un papel importante en el desarrollo de glioblastomas (Simon et al., 2002), se ha visto, por ejemplo, que la delección/mutación de los genes que codifican a la proteína de supresión tumoral, $p16^{INK4a}$, puede contribuir al desarrollo de GBM, así como otros mecanismos como la hipermetilación pueden inactivar el gen $p16^{INK4a}$ en muestras de glioma, por lo que la causa molecular exacta de GBM es aún difícil de descifrar (Hanif et al., 2017; Porter, 2012). Esto es de importancia debido a que se ha visto que distintas alteraciones de genes supresores de tumores se han considerado marcadores pronóstico en el glioma de alto grado, por lo que la expresión de $p16^{INK4a}$, que se ha usado como un biomarcador de pronóstico en varios cánceres junto con el estado de metilación y delección de este gen (Sibin et al., 2015) podría ser de importancia pronóstica. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la expresión y el estado de metilación de $p16^{INK4a}$ mediante inmunohistoquímica y MSP y la detección de VEB mediante qPCR de pacientes con glioblastoma se de una unidad médica de tercer nivel de atención del noreste de México.

2. ANTECEDENTES

2.1 Sistema nervioso central.

El sistema nervioso es el encargado de coordinar las funciones tanto conscientes como inconscientes que permiten la supervivencia del ser humano, esta formado por el sistema nervioso central y el sistema nervioso periférico. El sistema nervioso central (SNC) esta situada en el cráneo y la columna, por lo cual se compone de dos partes; el encéfalo y la médula espinal. El encéfalo se sitúa dentro del cráneo. La médula espinal se localiza en el interior de la columna (Sánchez, 2018). Las células gliales y las neuronales células del SNC, tienen la función de producir un sistema nervioso funcional. Las células neuronales trabajan para transmitir señales hacia y desde el cerebro, mientras que las células gliales actúan como el "pegamento" del SNC, ayudan a mantener la homeostasis, generan mielina y apoyan y protegen las células neuronales (Jäkel & Dimou, 2017).

2.2 Tumores del sistema nervioso central.

Los tumores del sistema nervioso central (SNC) representan el 2% de todas las neoplasias y causan el 2,6% de las muertes por cáncer (Kakshapati et al., 2018). Actualmente, la tasa de incidencia global es de 10.8 por cada 100,000 personas al año. La mortalidad por estos tumores aumenta a medida que incrementa la edad en la que son diagnosticados. En países desarrollados solamente el 14% de los pacientes diagnosticados con tumores del SNC tienen una supervivencia de más de 10 años y solo el 1% de ellos es prevenible. La incidencia de tumores primarios del SNC es mayor en población blancos que en afroamericanos, y la mortalidad es mayor en hombres que en mujeres (Mehta et al., 2011). Los tumores del SNC comprenden un grupo heterogéneo de neoplasias que exhiben una gran diversidad histológica y están confinados a cerebro, médula espinal, meninges, nervios craneales y paraespinales (Anaya-Delgadillo et al., 2016). Los tumores cerebrales representan del 85 al 90 % de todos los tumores primarios del SNC (Alegría-Loyola et al., 2017), y los tumores cerebrales primarios malignos más comunes son los gliomas (aproximadamente el 75%), una categoría de tumores que surgen de las células gliales o precursoras gliales, en los cuales se incluyen principalmente; meningiomas (27% de los tumores cerebrales primarios), astrocitomas anaplásicos y glioblastoma multiforme (38% de los tumores cerebrales primarios) (Mehta et al., 2011; Wood et al., 2019).

2.3 Glioblastoma multiforme.

El glioblastoma multiforme (GBM) es el glioma difuso más agresivo del linaje astrocítico y se considera un glioma de grado IV según la clasificación de la OMS, es el tumor maligno primario del sistema nervioso central (SNC) más común en adultos, supone más del 50% de estos y está asociado a un mal pronóstico ya que solo el 33% de los pacientes sobrevive al año y aproximadamente el 5% de los pacientes llegan a vivir más de 5 años tras el diagnóstico (Castañeda et al., 2015; De Vleeschouwer, 2017).

Se pueden clasificar como primarios y secundarios; los tipo primarios (o de novo), son llamados así, ya que surgen sin un precursor conocido; o secundaria, donde un tumor de bajo grado se transforma con el tiempo en glioblastoma. La mayoría de los GBM son primarios, y estos pacientes tienden a ser mayores y con un pronóstico más pobre que los pacientes con GBM secundarios (Hanif et al., 2017). Además, se dividen en tres subgrupos basados en la isocitrato deshidrogenasa 1 (IDH1) y el estado de mutación IDH2: IDH-mutante, IDH-tipo salvaje y NOS (no especificado de otra manera) (Taylor et al., 2019). El tipo primario *de novo* representa más del 80% de los GBM, ocurre en pacientes de edad avanzada, y típicamente muestra sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), mutación PTN (MM1), supresión/eliminación de CDKN2A (p16). El tipo secundario se desarrolla a partir de astrocitoma u oligodendrogliomas de grado inferior, ocurre en pacientes más jóvenes, y a menudo contiene mutaciones TP53 como la alteración detectable más temprana (Tamimi & Juweid, 2017).

2.4 Epidemiología

A pesar de que el glioblastoma multiforme es un tumor poco frecuente tiene una incidencia global de 10 por cada 100,000 personas y su mal pronóstico con una tasa de supervivencia de 14-15 meses después del diagnóstico lo convierte en un problema de importancia de salud pública. Puede ocurrir a cualquier edad, sin embargo, la incidencia máxima observada va de entre los 55 y 60 años, rara vez afecta a los niños, ya que solo representa el 8.8% de los tumores cerebrales infantiles (Hanif et al., 2017; Porter, 2012).

El GBM ocurre tanto en hombres como en mujeres, sin embargo, el tipo primario ocurre con mayor frecuencia en los hombres, mientras que los de tipo secundario ocurre

con mayor frecuencia en las mujeres. La incidencia étnica observada se ha visto mayormente en asiáticos, latinos y blancos (Porter, 2012). En México como en la mayoría de los países de Latinoamérica, son pocos los registros epidemiológicos especializados dedicados a este padecimiento (Anaya-Delgadillo et al., 2016).

2.5 Manifestaciones clínicas

La mayoría de los pacientes con GBM experimentan síntomas diferentes que incluyen dolores de cabeza, náuseas, vómitos y convulsiones. Otros síntomas comunes incluyen debilidad muscular y deterioro de la función cognitiva (Davis, 2016; Porter, 2012). Estos síntomas son producidos por tres mecanismos: por efecto directo, en el que el tejido cerebral es destruido como resultado de una necrosis que da lugar a síntomas como el déficit neuronal focal (40-60%) y deficiencias cognitivas, los signos y síntomas producidos dependen de las regiones del cerebro afectadas por el tumor, un tumor ubicado en el área del lóbulo temporal los los pacientes que muestran problemas auditivos y visuales, mientras que los ubicados en el el lóbulo frontal presentan un cambio de personalidad y afecta en las funciones cognitivas; por los efectos secundarios del aumento de la presión intracraneal, que es una consecuencia del aumento del tamaño del tumor y el aumento del edema que rodea el tumor, lo que conduce a un cambio en el contenido intracraneal, lo que resulta en dolores de cabeza que son una característica en el 30-50% de los pacientes y dependiendo de la ubicación del tumor, el 20-40% de los casos pueden presentar convulsiones, generalmente con un inicio focal, que podrían ser convulsiones simples parciales, complejas o generalizadas (Hanif et al., 2017; Omuro & DeAngelis, 2013).

2.6 Características macroscópicas e histopatológicas

El 95% de estos tumores surgen en la región supratentorial, mientras que solo un pequeño porcentaje de tumores ocurren en cerebelo, tronco encefálico y médula espinal (Hanif et al., 2017). Macroscópicamente, los GBM son heterogéneos y presentan hemorragia multifocal, necrosis y áreas quísticas y gelatinosas. Un rasgo característico es la variación en la apariencia macroscópica del tumor de una región a otra, algunas de las regiones como resultado de la necrosis tisular aparecen de color suave y amarillo, mientras que algunas de las áreas tumorales son firmes y blancas y algunas regiones muestran una marcada degeneración quística y hemorragia. El tumor generalmente está representado

por una lesión única, relativamente grande, de forma irregular que generalmente surge en la sustancia blanca (Hanif et al., 2017; Nelson y Cha, 2003).

Histológicamente, se asemeja a un astrocitoma anaplásico, es decir estos tumores demuestran una población de células pleomórficas que varía desde pequeñas células tumorales poco diferenciadas hasta grandes células multinucleadas con necrosis multifocal con núcleos pseudopalisantes y actividad mitótica prevalente. La proliferación de células endoteliales vasculares con frecuencia con estructura glomeruloide también es un rasgo característico (**Imagen 1**) (Hanif et al., 2017).

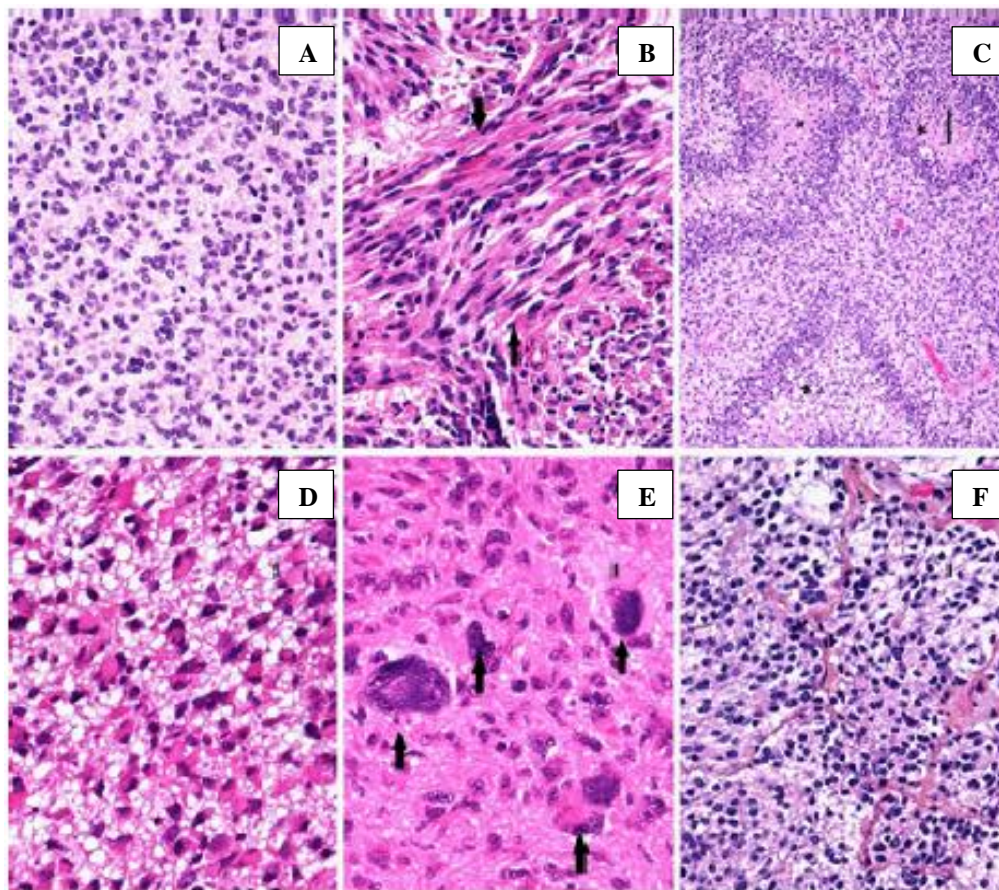


Figura 1. Características celulares y morfológicos de glioblastoma multiforme (HyE). **A.** Células pequeñas, **B.** Células fusiformes, **C.** Pequeñas necrosis y núcleos pseudopalisantes, **D.** Gemistocitos, **E.** Células gigantes, **F.** Componente oligodendroglia. Fuente: Modificado de Habberstad, Lind-Landstöm y Torp, 2012.

2.7 Factores de riesgo

La causa específica del glioblastoma multiforme es desconocida e identificar diversos factores de riesgo ha resultado difícil, se han sugerido muchos factores que aumentan el riesgo de desarrollarlos (Porter, 2012); sin embargo, solo se ha demostrado que la radiación ionizante es uno de los pocos factores de riesgo conocidos que definitivamente muestran un mayor riesgo de desarrollo de glioma, los GBM inducidos por radiación generalmente se ve años después de que la radiación terapéutica indicada para otro tumor o afección (Davis, 2016).

Actualmente no se ha encontrado una asociación concluyente entre esta patología y factores ambientales como el tabaquismo, los factores de riesgo de la dieta, los teléfonos celulares o el campo electromagnético, lesiones graves en la cabeza, factores de riesgo ocupacional y exposición a pesticidas (Hanif et al., 2017). Recientemente se ha puesto cada vez más énfasis una etiología viral, ya que proteínas virales y los ARN no codificantes de los virus pueden promover procesos oncogénicos sin oncotransformación directa a través de alteraciones en varias vías de señalización intracelular. Los virus pueden contribuir a la oncogénesis y al desarrollo de tumores en humanos al inducir inmunosupresión, modificar las células huésped a través de la inducción de oncoproteínas o alterar la expresión de proteínas de la célula huésped en los sitios de integración viral, ejemplos de virus con estas características son, el Citomegalovirus humano (CMV), Virus del papiloma humano (VPH) y Virus de Epstein-Barr (EBV) (Akhtar et al., 2018). Se conoce que la patología de GBM está intrínsecamente vinculada a la base molecular, existen modificaciones de la vía molecular y anomalías genéticas pueden conducir a la gliomagenesis, sin embargo, la combinación de varios eventos oncogénicos diferentes contribuye al desarrollo de GBM y, por lo tanto, la causa molecular exacta de GBM es difícil de descifrar. Los GBM primarios pueden ser inducidos por mutaciones diferentes. Por ejemplo, la eliminación completa del cromosoma 10, mutación y/o amplificación del gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), la delección/metilación de p16^{INK4a}, la mutación de p14ARF y p53, la metilación de RB1 y la metilación de MGMT (Hanif et al., 2017; Porter, 2012).

2.7.1 Virus de Epstein-Barr

El Virus Epstein–Barr (Human herpes virus 4) pertenece a la familia de los γ herpesvirus, es un virus con envoltura y núcleo, y su ADN bicatenario se encuentra rodeado por una nucleocápside icosaédrica, tiene una envoltura externa con espículas glicoprotéicas importantes para el reconocimiento de receptores y la posterior entrada a la célula hospedadora (Beltramino et al., 2005; Farrell, 2019; Plata et al., 2018). Está presente en casi el 90% de la población mundial, es transmitido principalmente a través de la saliva y los fluidos genitales. La infección por VEB puede ocurrir temprano en la infancia y establece una infección latente de por vida, generalmente asintomática, tiene dos ciclos de vida diferentes: un ciclo lítico agudo y una forma inactiva. En latencia, el VEB puede persistir dentro de las células B, que son los objetivos principales debido a su expresión de CR2, el principal receptor celular de este virus, también puede persistir en las células epiteliales, así como en algunas células T y asesinas naturales, y permanece invisible a los mecanismos de defensa (Limam et al., 2019).

El VEB posee un genoma de ADN doble cadena de 172 kb, que codifica más de 85 genes (Thompson & Kurzrock, 2004). El genoma viral consiste en una serie de repeticiones directas terminales (TR) en cada extremo y secuencias de repetición internas (IR) que sirven para dividir el genoma en dominios cortos (U_s) y largos (U_L) de secuencias únicas que tienen mayor capacidad codificante. Además, contiene dos orígenes de replicación OriP y OriLyt que son usados en ciclo de latencia y lítico respectivamente (Farrell, 2019; Thompson & Kurzrock, 2004). El VEB codifica varios oncogenes virales importantes para mediar la transformación y promover la oncogénesis, como lo son los antígenos nucleares: EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C y LP; y las proteínas de membrana latentes: LMP1, 2A y 2B; y pequeñas moléculas de ARN: EBER. Estudios de estos genes latentes han demostrado que EBNA2, EBNA3A, EBNA3C y LMP1 son esenciales para la transformación de los linfocitos B (Sisk et al., 2003) (**Figura 1**).

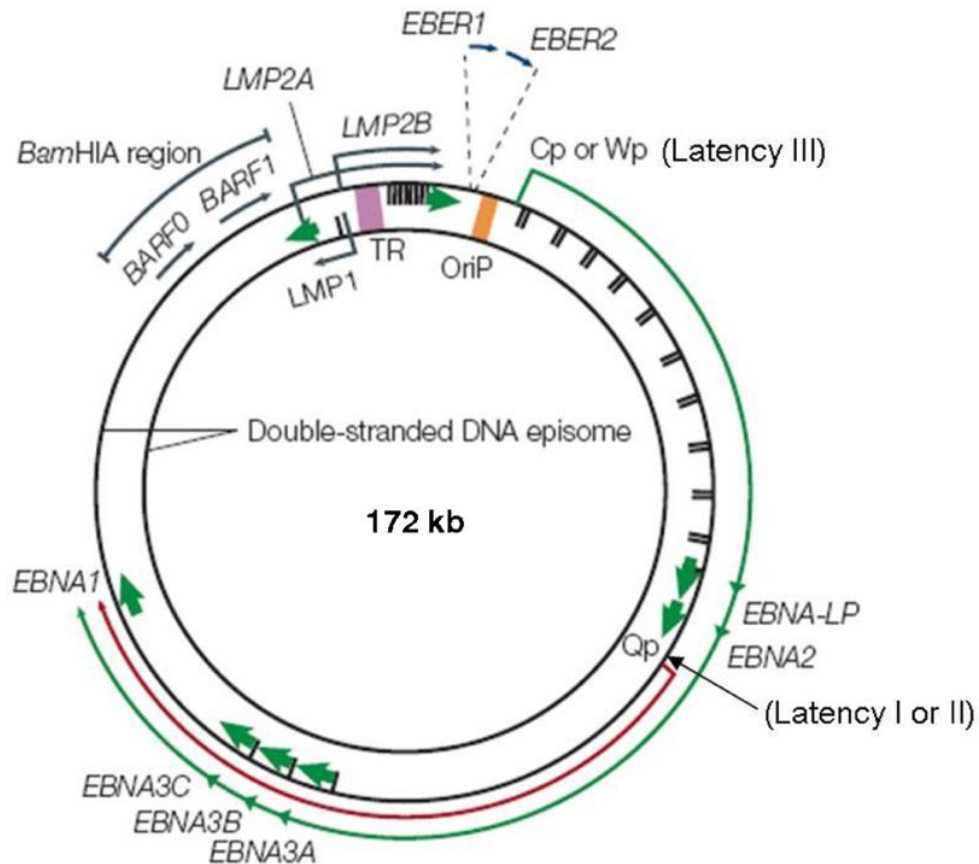


Figura 2. Representación esquemática de la organización del genoma de ADN circular del virus de Epstein-Barr. Fuente: Thawe, 2012.

El ADN genómico del VEB se ha detectado en muestras de glioma de alto grado, sin embargo, los mecanismos de patogénesis aún no están claros. En general, se desconoce hasta qué punto los virus del herpes humano están asociados con GBM (Lin et al., 2016).

2.7.2 Glioblastoma multiforme e infección por Virus de Epstein-Barr

Varios estudios mostraron cómo la expresión de proteínas virales desempeña un papel en el desarrollo de tumores, en GBM, hasta ahora dicho efecto no ha sido completamente claro, y continúa en debate, algunos estudios informan que no hay asociación para VEB y GBM, mientras que otros describen solo la presencia del virus, sin embargo, el resultado puede verse influenciado por el tamaño de la muestra de casos analizados. Un estudio reciente asoció la presencia de VEB en pacientes con GBM con peor pronóstico. En un estudio, se analizaron 29 pacientes adultos diagnosticados con glioblastoma para establecer la prevalencia de virus Epstein-Barr, estudiaron la posible influencia de dicho virus en la evolución de GBM, y observaron una prevalencia

considerable de casos fue positiva para VEB (28.6%) (Zavala-Vega et al., 2017). En otro estudio realizado por Wrensch y colaboradores encontraron que el 86% de las muestras de gliomas de alto grado tenían la presencia del VEB en suero de pacientes (Wrensch et al., 2001). Hashida y colaboradores en un estudio de 39 biopsias de pacientes con gliomas de alto grado encontro una prevalencia del 0% del VEB en las muestras analizadas (Hashida et al., 2015). Debido a estos resultados controversiales, la importancia de la búsqueda del VEB en gliomas se ha vuelto de gran importancia (Akhtar et al., 2018).

Se ha observado que la infección por VEB, las proteínas LMP1, LMP2, EBER, EBNA y BART juegan papeles importantes en la diferenciación y proliferación de la célula, así como en la modulación de la apoptosis y, por lo tanto, en la supervivencia celular (Zavala-Vega et al., 2017).

2.7.3 Proteína de supresión tumoral p16^{INK4a}

El gen supresor tumoral p16, ubicado en el cromosoma 9p21, es un miembro de la clase INK4 de inhibidores del ciclo celular (El-Naggar & Westra, 2012). p16^{INK4a} es una fosfoproteína, producto del gen supresor de tumor CDKN2 que se encarga de, al igual que otras proteínas, regular la progresión del ciclo celular al actuar como un inhibidor de kinasas dependientes de ciclinas, estas últimas tienen como función principal fosforilar a la proteína supresora de tumor pRb la cual a su vez en estado hipofosforilado cuando es requerido, se mantiene unida al factor de proliferación E2F, impidiendo de esta forma que el ciclo celular progrese desde la fase G1 a la fase S (Patzi et al., 2006).

El via p16^{INK4a}-Cdk4-Rb regula críticamente la progresión de la fase G1 a S, esto en respuesta a la señalización mitogénica, los complejos ciclina D/Cdk4, ciclina D/Cdk6 y ciclina E/Cdk2 cooperan para fosforilar la proteína retinoblastoma supresora de tumores (Rb) en residuos de serina y treonina, la fosforilación interrumpen la represión transcripcional mediada por Rb y facilitan la progresión a la fase S, la actividad de Cdk4/6 es suprimida por p16^{INK4a} (Solomon et al., 2008).

p16^{INK4a} es un regulador negativo de la proliferación celular, por lo que se considera un factor principal para eludir la formación de tumores. Alrededor del 50% de todos los canceres humanos presentan de un 25-70% inactivacion de p16^{INK4a}, entre estos se encuentran los carcinomas de cabeza y cuello, esófago, vías biliares, hígado, pulmón,

vejiga, colon, mama, leucemia, linfomas, y glioblastomas (Serrano 1997). Se han descrito varios mecanismos en estos tumores por los que el gen p16^{INK4a} se encuentra inactivado, por ejemplo, deleciones homocigóticas, pérdida de heterocigosidad, mutaciones puntuales y metilación del promotor (Romagosa et al. 2011).

Aunque la pérdida de p16^{INK4a} se reconoce como un evento importante en la progresión tumoral, también se ha observado que un aumento en la expresión de esta proteína es importante para la transformación maligna posterior (Romagosa et al. 2011).

2.7.4 Metilación en región promotora de p16^{INK4a}

La metilación del ADN es una modificación epigenética importante, consta de la adición covalente de un grupo metilo en la posición 5-C de la citosinas que se encuentran en 5' de una base de guanosina en un dinucleótido CpG, esto es catalizado por la enzima metiltransferasas (*DNMTs*) (Jin & Robertson, 2011). Los dinucleótidos CpG se encuentran distribuidos en el genoma, los CpG que se encuentran agrupados en pequeños tramos del ADN, con un contenido de GC mayor a 50% han sido denominadas islas CpG. En las células normales, la mayoría de los sitios CpG fuera de las islas CpG se encuentran metilados, mientras que las islas CpG en sitios de promotores génicos generalmente no están metiladas, independientemente del estado de transcripción del gen (Zvonko Magic, 2013).

El cambio en el patrón de metilación es uno de los eventos más frecuentes en el proceso de carcinogénesis (Demokan, 2011). Existen dos tipos de cambios en las metilaciones del ADN: la hipermetilación de las islas CpG y la hipometilación global en una gran variedad de tumores. La hipermetilación del ADN se ha asociado con la represión de los genes supresores de tumores (como p16^{INK4a}, p53, DAPK, y RASSF1A) y la inestabilidad genómica, por otro lado, la hipometilación del ADN se encuentra asociada con la activación de oncogenes y la inestabilidad cromosómica, lo que conduce a una sobreexpresión de estos. Se ha visto que la metilación del ADN tiene un papel en la iniciación y progresión tumoral (Demokan, 2011; Sabir et al., 2014; Uribe Yunda & Cortes, 2014).

El gen supresor de tumores p16^{INK4a} se encuentra con gran frecuencia inactivado en una gran variedad de cáncer humanos (Witcher & Emerson, 2009). La baja expresión

de la proteína de p16^{INK4a} se ha asociado a la hipermetilación aberrante del ADN en diversos procesos tumorales (García et al., 1999; Valenzuela et al., 2002). La hipermetilación se produce en las citosinas de las regiones CpG que usualmente no se encuentran metiladas en tejidos sanos. Se ha asociado a la hipermetilación de los promotores de genes supresores de tumores y de reparación del ADN con la condensación de la cromatina, el retraso de la replicación, la inhibición del inicio de la transcripción y el silenciamiento génico. Se ha visto en diferentes estudios, que p16^{INK4a} se encuentra inactivado debido a la hipermetilación en de su región promotora rica en CpG (Jin & Robertson, 2011; Valenzuela et al., 2002).

2.7.5 Glioblastoma multiforme y p16^{INK4a}

La proteína p16^{INK4a} regula el control del ciclo celular en la transición G1-S y su inactivación conduce a la pérdida del control del ciclo celular y al aumento de la proliferación (Park et al., 2021). Simon et al mencionan que hay evidencia que apuntan que el supresor de tumores y regulador del ciclo celular p16^{INK4a} tiene un papel importante en el desarrollo de glioblastomas (Simon et al., 2002). Se ha observado que aproximadamente en el 78% de los tumores GBM tienen defectos en la vía p16^{INK4a}-Cdk4-Rb. Las lesiones específicas incluyen la eliminación homocigótica de CDKN2A/2B (52%), la amplificación de CDK4 (18%), la amplificación de CDK6 (1%) y la eliminación o mutación de RB (12%) (Solomon et al., 2008).

Existen diversos estudios en gliomas de alto grado donde mencionan que hay una pérdida de la expresión de la proteína de p16^{INK4a}, Pudevalli y colaboradores encontraron que la inmunorreactividad de p16^{INK4a} estuvo ausente en el 56% de las muestras de glioblastoma multiforme y en el 77.5% de los astrocitomas anaplásicos (Pudevalli et al., 2000). Purkait y colaboradores detectaron una inmunonegatividad de la proteína p16^{INK4a} en el 52,2% de los casos de glioblastoma (Purkait et al., 2013). Costello et al. Mencionan que la expresión de la proteína de p16^{INK4a} no fue detectada en el 50% de los gliomas de alto grado, por lo que dicen que a pesar de que no se encontro alguna delección o mutación de los genes que codifican a esta proteína pueden haber otros mecanismos, como la metilación, que puede conllevar a la inactivación de p16^{INK4a} en los gliomas (Costello et al., 1996). Lam et al tambien mencionan aun que es un evento raro, la hipermetilación o

mutaciones puntuales inactivantes del gen p16^{INK4a} en muestras de tumores de glioma (Lam et al., 2000).

En un estudio realizado se encontro una alta frecuencia de la hipermetilación del promotor de p16^{INK4a} en pacientes con gliomas, se observó que los altos niveles de metilación en MGMT, p16^{INK4a} y THBS1 predecían una supervivencia inferior, mencionan que el análisis de la hipermetilación de promotores parece ser prometedor como un factor pronóstico en el glioma (Bo-Lin et al., 2010). Sin embargo, aun se tiene más por investigar. Se ha visto que distintas alteraciones de genes supresores de tumores se han considerado marcadores pronóstico en el glioma de alto grado, la expresión de p16^{INK4a} se ha usado como un biomarcador de pronóstico en varios cánceres junto con el estado de metilación y delección de este gen (Sibin et al., 2015).

3. JUSTIFICACIÓN

El glioblastoma multiforme (GBM) es el glioma difuso más agresivo, es el tumor maligno primario del sistema nervioso central (SNC) más común en adultos, a pesar de que es un tumor poco frecuente tiene una incidencia global de menos de 10 por cada 100,000 personas y su mal pronóstico con una tasa de supervivencia de 14-15 meses después del diagnóstico lo convierte en un problema crucial de salud pública. Se ha visto la presencia de ADN genómico del VEB en muestras de GBM, sin embargo, por lo que los mecanismos de patogénesis aún no están claros. En general, se desconoce hasta qué punto los virus del herpes humano están asociados con GBM, sin embargo, se ha visto que algunas proteínas de este virus, como LMP1, LMP2, EBER, EBNA y BART juegan papeles importantes en la diferenciación y proliferación de la célula, así como en la modulación de la apoptosis y, por lo tanto, en la supervivencia celular. También se ha visto que las metilaciones del promotor en el gen que codifica a la proteína p16^{INK4a}, conlleva a una baja expresión de esta, este es un evento genético característico que impulsa la patogénesis de GBM. Algunos otros estudios han mostrado una co-relación entre la infección del VEB y la baja expresión de la proteína p16^{INK4a}. En México son pocos los registros epidemiológicos especializados dedicados a este padecimiento.

4. HIPÓTESIS

La expresión de la proteína p16^{INK4a} está correlacionada con la metilación de su promotor y con la presencia del VEB en tumores del SNC con diagnóstico histopatológico de GBM y a su vez, se relaciona con las características clínicas y la sobrevida de los pacientes de una unidad médica de tercer nivel del noreste de México.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general.

Evaluar la prevalencia del virus de Epstein–Barr y el estado de metilación de la región promotora de p16^{INK4a} y su expresión en glioblastoma multiforme de pacientes de una unidad médica de tercer nivel del noreste de México.

5.2 Objetivos específicos

- 5.2.1** Identificar retrospectivamente tumores del SNC con diagnóstico histopatológico de GBM por el Departamento de Anatomía Patológica de la Unidad Médica de Alta Especialidad No. 25 del Instituto Mexicano del Seguro Social en el noreste de México y conjuntar la información clínica y de sobrevida de los pacientes.
- 5.2.2** Evaluar la prevalencia de la infección por VEB en tumores del SNC con diagnóstico histopatológico de GBM de pacientes de una unidad médica de tercer nivel del noreste de México.
- 5.2.3** Evaluar la expresión de p16^{INK4a} en tumores del SNC con diagnóstico histopatológico de GBM de pacientes de una unidad médica de tercer nivel del noreste de México.
- 5.2.4** Evaluar el estado de metilación del promotor de p16^{INK4a} en tumores del SNC con diagnóstico histopatológico de GBM de pacientes de una unidad médica de tercer nivel del noreste de México.
- 5.2.5** Correlacionar el estado de metilación del promotor de p16^{INK4a} con su expresión y los datos clínicos y la sobrevida de los pacientes con GBM de una unidad de médica de tercer nivel del noreste de México.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Diseño del Estudio

Transversal, observacional, descriptivo y retrospectivo con autorización por la Comisión Nacional de Investigación Científica del IMSS (Comisión de Ética y Científica).

6.2 Conjunción del grupo de estudio.

Se recolectaron muestras fijadas en formalina y embebidas en parafina (FFyEP) de tejido cerebral de pacientes con diagnóstico clínico de glioblastoma del Departamento de Anatomía Patológica de la Unidad Médica de Alta Especialidad No. 25 (UMAE 25) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) en Monterrey, Nuevo León, que fueron obtenidas y procesadas en el período del 01 de enero de 2016 al 31 de diciembre de 2019. El consentimiento informado no fue requerido debido a que se trata de un estudio retrospectivo en el que se emplearon especímenes del banco de tumores. Toda la información y datos clínico-epidemiológicos de los pacientes fueron recabados a partir de sus expedientes institucionales, garantizando la confidencialidad y el resguardo apropiado de toda la información obtenida. Se realizó una reevaluación histopatológica con tinciones de hematoxilina y eosina (H&E) para descartar especímenes que no cumplieran con los criterios de selección e inclusión; de esta forma, se eliminaron casos que no presentaban características morfo-histológicas de GBM o que no presentaban suficiente tejido viable. Se descartaron también los especímenes con información clínica no disponible o incompleta.

6.3 Extracción de ADN

Mediante punción con sacabocados de la zona del tumor de cada espécimen se obtuvieron 2 muestras de 2 mm de diámetro y se prosiguió con la extracción de ADN empleando el kit de extracción *NucleoSpin DNA FFPE XS* (Macherey–Nagel, Düren, Alemania). De acuerdo al protocolo indicado por el fabricante, el procedimiento inició con un proceso de desparafinización con solución disolvente e incubación por 3 min a 60 °C e inmediatamente se realizó agitación en vortex; después el proceso de lisis celular con Buffer FL y proteinasa K e incubación de al menos 3 horas. Posteriormente, se utilizaron columnas de afinidad para la purificación del ADN realizando un par de lavados para finalizar con la elución del producto. Se midió la concentración y pureza del ADN obtenido de cada muestra mediante lecturas espectrofotométricas a 260 y 280 nm, así

como la relación A260/A280 y A260/A230 obtenidas de NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, DE, EUA). Todas las muestras de ADN fueron almacenadas a -20 hasta su uso posterior.

6.4 Detección del VEB mediante qPCR.

La detección de ADN del VEB se realizó mediante reacciones independientes de qPCR empleando cebadores y sondas de hidrólisis diseñadas a partir de un ensayo anteriormente publicado (Ryan, 2004). Previo a las reacciones de amplificación, todas las muestras de ADN fueron ajustadas a una concentración de 50 ng por μL en un volumen final de 20 μL . Para la detección del VEB se emplearon un par de oligonucleótidos y sonda para la amplificación de una región del gen de la glicoproteína de membrana LMP2 (NCBI, GenBank–No. Acceso: V01555) que generaron un producto final de amplificación de 69 pb de longitud (**Tabla 1**) (Vazquez-Guillen, 2018).

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de la region LMP2 del VEB.

Amplicon	Nombre	Secuencias de oligonucleótidos	Posición	Tm (°C)
VEB 70 pb	OligoF	5'-AGC TGT AAC TGT GGT TTC CAT GAC-3'	679-702	57
	Sonda	6FAM'5-CTG CTG CTA CTG GCT TTC GTC CTC TGG-3' TAMRA	704-731	64
	OligoR	5'-GCC CCC TGG CGA AGA G-3'	733-748	60

Para la estandarización de las reacciones y ensayos de límites de detección, así como para control positivo de amplificación, se empleó un bloque de ADN sintético (gBlock Gene Fragment, IDT– Integrated DNA Technologies, California, US) cuya secuencia incluyó la región de amplificación de LMP2 del VEB (**Figura 3**).

```

5'- AGG TCT TCA AGG AAC TCA GCA AGA TCA ACC CGT 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
TTC 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 3. Secuencia del bloque de ADN sintético diseñado para emplearse como control positivo de amplificación de LMP2 del VEB. Resaltado con rojo se indica el amplicón del VEB.

Todas las reacciones fueron realizadas empleando el reactivo GoTaq® Probe qPCR Master Mix (Promega, Wisc, USA) y siguiendo las concentraciones indicadas por el fabricante en el equipo termociclador Light Cycler (Roche) de la Unidad de Genómica el

Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS) de la UANL. El programa de amplificación inició con un paso previo de incubación a 95°C por 2 min para activación de la GoTaq® DNA Polymerase, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 15 seg y alineamiento y extensión a 60 °C por 1 min, para finalizar a 4 °C (**Tabla 2**).

Tabla 2. Programa de amplificación de la region LMP2 del VEB.

Paso	Numero de ciclos	Temperatura	Tiempo
Activacion de GoTaq® DNA Polymerase	1	95°C	2 minutos
Desnaturalización	40	95°C	15 segundos
Alineamiento y extensión		60°C	1 minuto

6.5 Evaluación de la expresión de p16^{INK4a} mediante inmunohistoquímica

6.5.1 Corte de tejido y montaje en laminillas

Los bloques de tejido cerebral FFyEP fueron llevados al servicio de anatomía patológica y citopatología Medicina Diagnóstica S.A. para la realización y colocado de cortes histológicos de 4 µm de espesor en portaobjetos recubiertos de 3-aminopropiltriethoxisilano (portaobjetos silanizados) empleando un microtomo semi-automático Leica RM2125 RTS. Además, se realizaron cortes histológicos de 4 µm de tejido tumoral de cervix FFyEP que fueron colocados en cada laminilla para ser empleados como control de la tinción inmunohistoquímica de p16^{INK4a}.

6.5.2 Tinción inmunohistoquímica de p16^{INK4a}

Como preparación previa a la inmunotinción se incubaron todas las laminillas a 60 °C durante 12-15 horas. El protocolo de desparafinización comenzará colocando las laminillas en una cubeta de tinción con xilol durante 5 minutos y este paso se repitió en otra cubeta con xilol durante el mismo tiempo. Posteriormente, se realizó la hidratación sumergiendo cada laminilla en diferentes cubetas durante 3 minutos con etanol absoluto, alcohol al 96%, alcohol al 80%, agua destilada y para finalizar en solución amortiguadora de fosfatos (PBS). A continuación se realizó la recuperación antigénica empleando el equipo PT Link (DAKO, California, EUA), en el que se incubaron todas las laminillas en solución amortiguadora de Tris-EDTA (pH 9) a 98 °C durante 20 minutos.

Para la realización de la inmunodetección se empleó el Mouse and Rabbit specific HRP/DAB (ABC) Detection IHC Kit (Abcam, Cambridge, UK). Las laminillas fueron recubiertas con peróxido de hidrógeno e incubadas durante 5 minutos en una cámara de humedad y lavadas con PBS por 3 minutos. Posteriormente se recubrieron con solución bloqueadora de proteínas durante 5 minutos y lavados con PBS por 3 minutos. A continuación, el tejido fue recubierto con el anticuerpo monoclonal Anti-CDKN2A/p16^{INK4a} [EPR1473]-C-terminal (ab108349) (Abcam, Cambridge, UK) preparado a una concentración final de 1:100 durante 30 minutos y fue lavado en solución PBS durante 3 minutos. Seguido de esto, se colocó el anticuerpo secundario biotinilado en las laminillas por 10 minutos y se realizó un lavado durante 3 minutos en PBS. Después, se añadió estreptavidina peroxidasa e incubó por 10 minutos, seguido de un lavado durante 5 minutos en PBS. Después se recubrió durante 5 minutos con 3,3'-diaminobenzidina (DAB) que fue previamente preparada mezclando 30 µL de cromógeno DAB por cada mililitro de sustrato DAB. Finalmente, se realizó un lavado en agua y se añadió hematoxilina durante 45 segundos para finalizar lavando con agua. Para el protocolo de deshidratación las laminillas, estas se sumergieron 10 veces en cada cubeta con alcohol al 80%, alcohol al 96% y etanol absoluto, posteriormente en xilox por duplicado. Finalmente, se realizó el sellado con resina colocando una gota de resina sobre el tejido y cubriéndolo con un cubreobjetos evitando la formación de burbujas.

6.5.3 Evaluación de la expresión de p16^{INK4a}

Cada laminilla teñida fue examinada al microscopio óptico por un médico especialista en patología, quien determinó el porcentaje de expresión de p16^{INK4a} con base en el grado de tinción nuclear. Las muestras con 25% o menos de células teñidas fueron consideradas como negativas para la expresión de p16^{INK4a}. Por otra parte, la muestras positivas fueron catalogadas en expresión baja (26-50% de células teñidas), expresión moderada (51-75%), y expresión alta (>75%).

6.6 Perfil de metilaciones en promotor de p16^{INK4a}.

6.6.1 Modificación con bisulfitos

A partir de 20 µL del ADN previamente extraído se prepararon reacciones de modificación con bisulfito de sodio utilizando el kit EZ DNA Methylation-Lightning

(Zymo Research, CA, USA). El tratamiento con bisulfito modifica químicamente a cada citosina no metilada en uracilo y deja las citosinas metiladas sin cambios. Siguiendo el protocolo brindado por el fabricante, se ajustaron 1000 ng del ADN purificado en el volumen final de 20 μL y se sometió a una desnaturalización y reacción de conversión con 130 μL del reactivo Lightning Conversion Reagent a 98°C por 8 min y 54°C por 60 min en el termociclador; posteriormente, en un tubo de recolección con columna se llevó a cabo un proceso de unión (M-Binding Buffer) y lavado (M-Wash Buffer), seguido de un proceso de desulfonación (L-Desulphonation Buffer) y limpieza (M-Wash Buffer). Para finalizar, el ADN modificado con bisulfito fue eluido en 10 μL de agua inyectable y se almaceno a -20 °C hasta su uso posterior.

6.6.2 Amplificación por PCR específica para metilaciones (MSP)

El estado de metilación del promotor de p16^{INK4a} se determinó por la técnica PCR específica para metilaciones (MSP; *Methylation-specific PCR*) mediante la amplificación de un fragmento de ADN modificado con bisulfito de cada muestra utilizando oligonucleótidos que hibridan específicamente en regiones modificadas y no modificadas del promotor y que fueron previamente establecidos por Sippi et al., 2018 (**Tabla 3**). Las amplificaciones se llevaron a cabo con el kit de TaKaRa EpiTaq™ HS (for bisulfite-treated DNA) (Takara Bio, Kasatsu, Japón). Según el protocolo establecido por el fabricante, se preparó una mezcla para cada reacción en un volumen final de 25 μL para cada par de cebadores; se incluyeron 1.5 μL de EpiTaq PCR Buffer 10X, 1.8 μL de MgCl₂ 25 mM, 1.8 μL de dNTP 2.5 mM, 0.075 μL de TaKaRa EpiTaq HS, 0.1 μL de los oligonucleótidos sentido y antisentido a 10 μM , 2 μL de ADN modificado y se completó a un volumen final a 25 μL con agua. Las condiciones para la amplificación fueron las siguientes: Desnaturalización a 94°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos a 94°C de 30 segundos, después 30 segundos a la temperatura de hibridación específica de los cebadores (**Tabla 3**), después 72 °C por 30 segundos, posteriormente un paso de extensión final a 72 °C durante 7 minuto, y para finalizar un paso de refrigeración (opcional) a 4°C durante varias horas. En cada experimento se utilizaron los controles positivos comerciales Human Methylated & Non-methylated DNA Set (Zymo Research, Orange, CA, E.U.A.) y agua libre de nucleasas como control negativo para evaluar la eficiencia de la conversión de bisulfito del ADN. Los productos de la PCR resultantes se analizaron en

geles de agarosa al 2.5% teñidos con bromuro de etidio y se visualizaron con iluminación ultravioleta utilizando un transiluminador GelDocXR (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, Francia).

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados para amplificar un fragmento de la región promotora del gen p16^{INK4a} mediante MSP.

Gen	Estado		Secuencia (5'-3')	Tm (°C)	Amplicón
p16 ^{INK4a}	Metilado	F	TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC	63.4	150
		R	GACCCCGAACCGCGACCGTAA		
	No metilado	F	TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT	60.9	151
		R	CAACCCCAAACCACAACCATAA		

6.7 Análisis estadístico

Se analizaron los expedientes médicos las características clínicas y sociodemográficas de los pacientes. Los resultados se muestran en frecuencias absolutas, porcentajes o medianas y rangos. Se emplearon las pruebas de U de Mann-Whitney, X² de Pearson y la prueba exacta de Fisher. Los análisis de supervivencia se realizarán por el método de Kaplan-Meier. Se consideró como significativo un valor de p <0.05. Todos los análisis fueron realizados en el programa IBM SPSS Statistics (Version 20, SPSS. Inc., Chicago, E.U.A.).

7. RESULTADOS

7.1 Población en estudio y análisis de los casos.

De 110 muestras colectadas, se descartaron todas aquellas que no cumplieron con características morfo-histológicas de glioblastoma multiforme, con información clínica incompleta, así como las que no presentaban suficiente tejido viable (**Figura 4**).

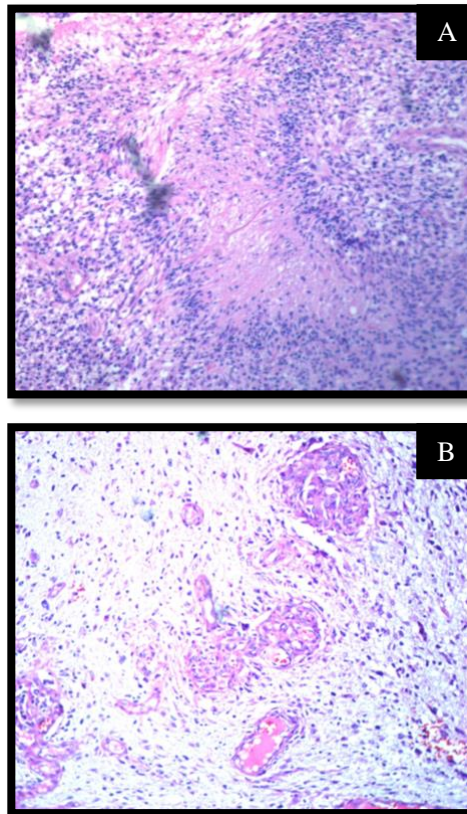


Figura 4. Tinción de hematoxilina y eosina de tejido cerebral con diagnóstico de glioblastoma multiforme. A) Necrosis en empalizada, B) Hiperplasia endotelial vascular.

El grupo de estudio fue conformado por un total de 61 especímenes FFyEP de tejido cerebral con glioblastoma multiforme y datos clínicos y epidemiológicos completos. El total de las muestras colectadas se encontraban en un rango de edad de 6 a 83 años, de la cuales 25 (41.0%) pertenecían al grupo de edad de mayor de 60 años y 35 (55.7%) al género masculino. La supervivencia menor a 12 meses se observó en 44 (67.7%) de los pacientes. El principal sitio de localización observada fue en el hemisferio cerebral derecho (HCD) en el 54.12% de las muestras y solo 7 (11.4%) de los pacientes tuvieron una resección quirúrgica total del tumor. Un total de 24 (39.3%) pacientes

presentaron recidiva de glioblastoma multiforme. La mayoría de los pacientes se encontraban en la escala de ECOG 4 (39.3%). El 47.5% de los pacientes no obtuvieron algún tratamiento de quimioterapia (QT) y/o radioterapia (RT), la mayoría recibió QT y/o RT o ambas, el 4.9% recibieron QT, el 9.8% recibieron RT y el 37.7% recibieron ambas terapias (**Tabla 4**).

Tabla 4. Características clínico-histopatológicas de 61 pacientes con GBM.

	Total
Edad (años)	56.5 (6-83)
≥60 años	25 (41.0%)
<60 años	36 (59.0%)
Genero	
Masculino	34 (55.7%)
Femenino	27 (44.3%)
Supervivencia	
≥12 meses	17 (27.9%)
<12 meses	44 (72.1%)
Localización	
HCD	33 (54.1%)
HCI	25 (41.0%)
LM	3 (4.9%)
Resección quirúrgica	
Total	7 (11.4%)
Subtotal	25 (40.1%)
Parcial	29 (47.5%)
Recidiva	
Si	24 (39.3%)
No	37 (60.7%)
ECOG	
0 ^a	1 (1.6%)
1 ^b	13 (21.3%)
2 ^c	6 (9.9%)
3 ^d	17 (27.9%)
4 ^e	24 (39.3%)
5 ^f	-
Tratamiento	
QT	3 (4.9%)
RT	6 (9.8%)
Ambas	23 (37.7%)
Ninguna	29 (47.5%)

Los valores se muestran en frecuencias absolutas (porcentaje). La edad es presentada como mediana (rango). Los pacientes:

^a Se encuentran asintomáticos, son capaz de realizar un trabajo y actividades normales.

^b Presentan síntomas que le impiden realizar trabajos, se desempeña normalmente en sus actividades.

^c No son capaz de desempeñar ningún trabajo, y con síntomas que le obligan a permanecer en la cama.

^d Estan en cama más de la mitad del día. Necesitan ayuda para la mayoría de las actividades.

^e Permanecen encamados y necesitan ayuda para todas las actividades de la vida diaria.

^f Fallecieron.

7.2 Detección del Virus de Epstein-Barr en glioblastoma multiforme.

Se determino la presencia del virus de Epstein-Barr en 61 muestras de GBM mediante reacciones independientes de qPCR. De estas, se encontro una prevalencia del 0.0% a la presencia del VEB (**Figura 5**).

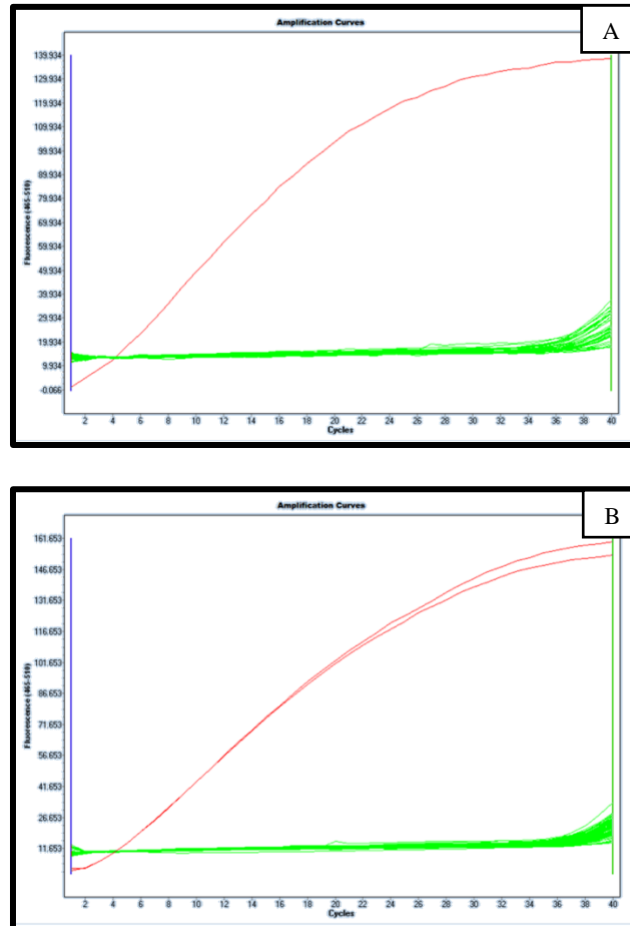


Figura 5. Curvas de amplificación. **A.** Curva de amplificación de 20 muestras (verde) de GBM negativas a la presencia del VEB y del bloque sintético de ADN con secuencia control de la proteína LMP1 del VEB (rojo). **B.** Curva de amplificación de 41 muestras (verde) de GBM negativas a la detección de ADN del VEB y del bloque sintético de ADN con secuencia control de la proteína LMP1 (rojo).

7.3 Evaluación de la expresión de p16^{INK4a} en glioblastoma multiforme.

Se determino el nivel de expresión de p16^{INK4a} en 49 laminillas con tinción por HyE e IHQ. Las muestras con <25% de células teñidas fueron consideradas como negativas. Por otra parte, la muestras positivas fueron catalogadas en expresión baja (26-50%), expresión moderada (51-75%), y expresión alta (>75%) (**Figuras 6-9**).

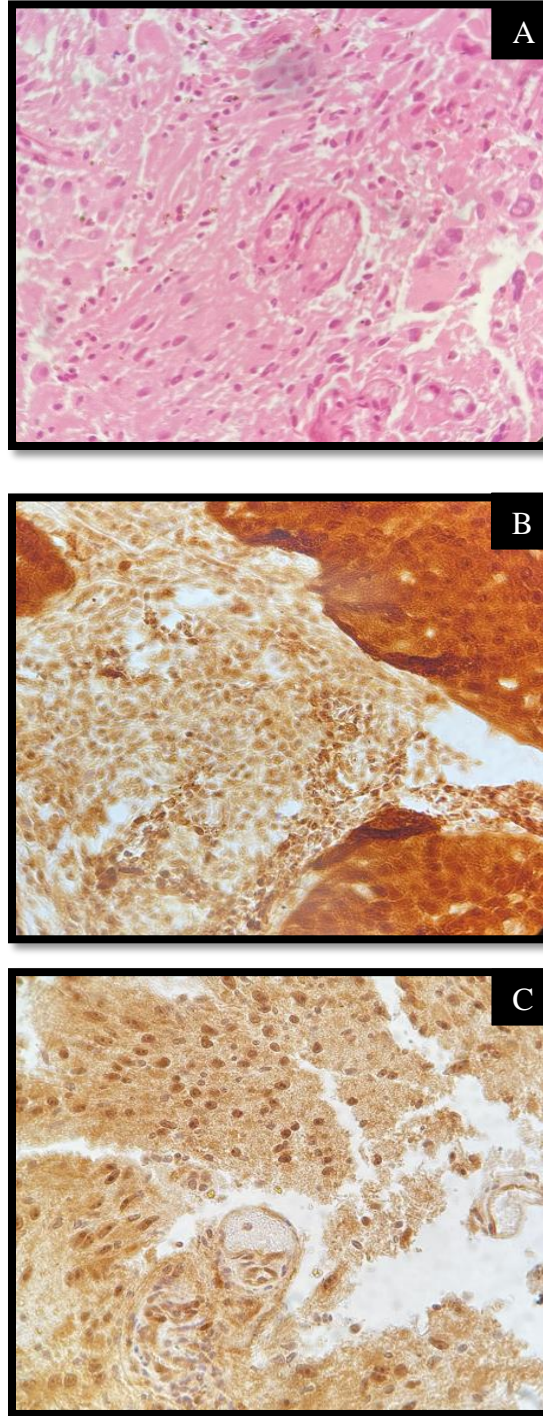


Figura 6. Tinción IHQ para p16^{INK4a} en GBM del paciente No. 40. **A)** Tinción del tumor con hematoxilina y eosina. **B)** Expresión de p16^{INK4a} por IHQ en tumor de cervix. **C)** Expresión negativa (< 25% de núcleos teñidos) de p16^{INK4a} por IHQ en GBM.

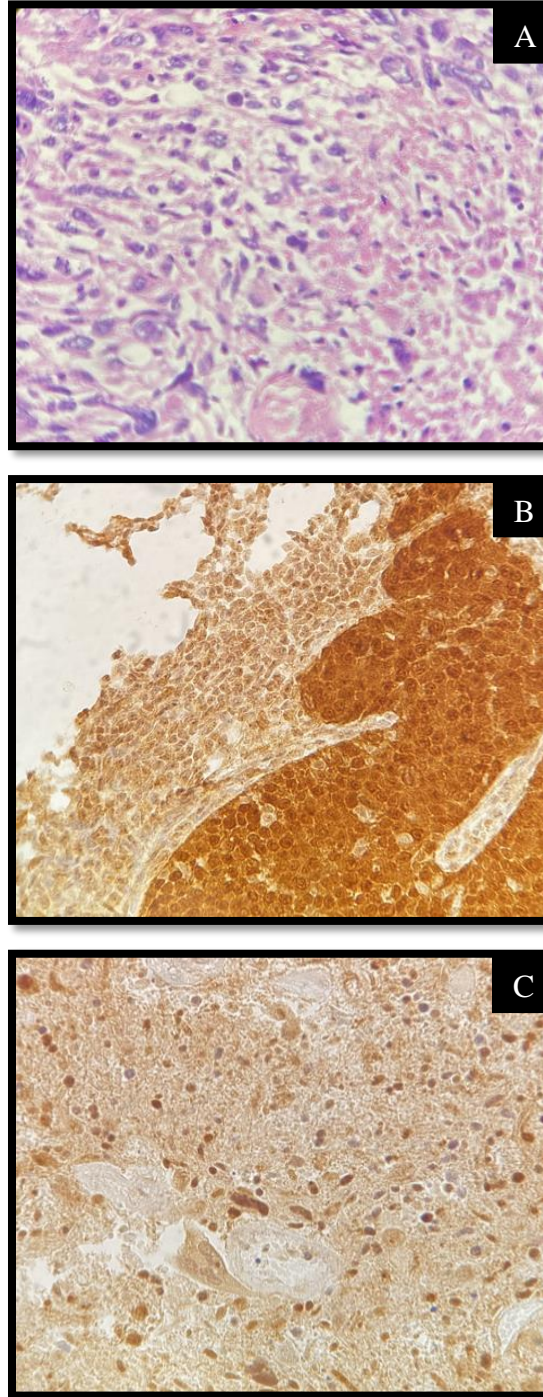


Figura 7. Tinción IHQ para p16^{INK4a} en GBM del paciente No. 58. **A)** Tinción del tumor con hematoxilina y eosina. **B)** Expresión de p16^{INK4a} por IHQ en tumor de cervix. **C)** Expresión positiva baja (25 – 50 % de núcelos teñidos) de p16^{INK4a} por IHQ en GBM.

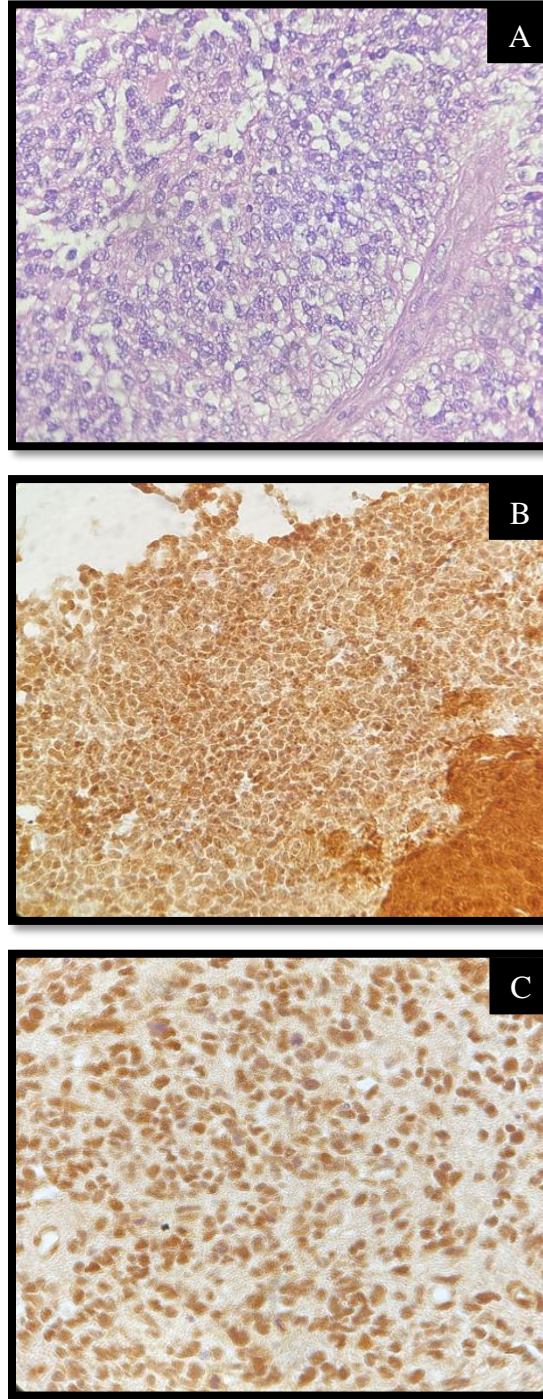


Figura 8. Tinción IHQ para p16^{INK4a} en GBM del paciente No. 18. **A)** Tinción del tumor con hematoxilina y eosina. **B)** Expresión de p16^{INK4a} por IHQ en tumor de cervix. **C)** Expresión positiva moderada (50 -75 % de nucleos teñidos) de p16^{INK4a} por IHQ en GBM.

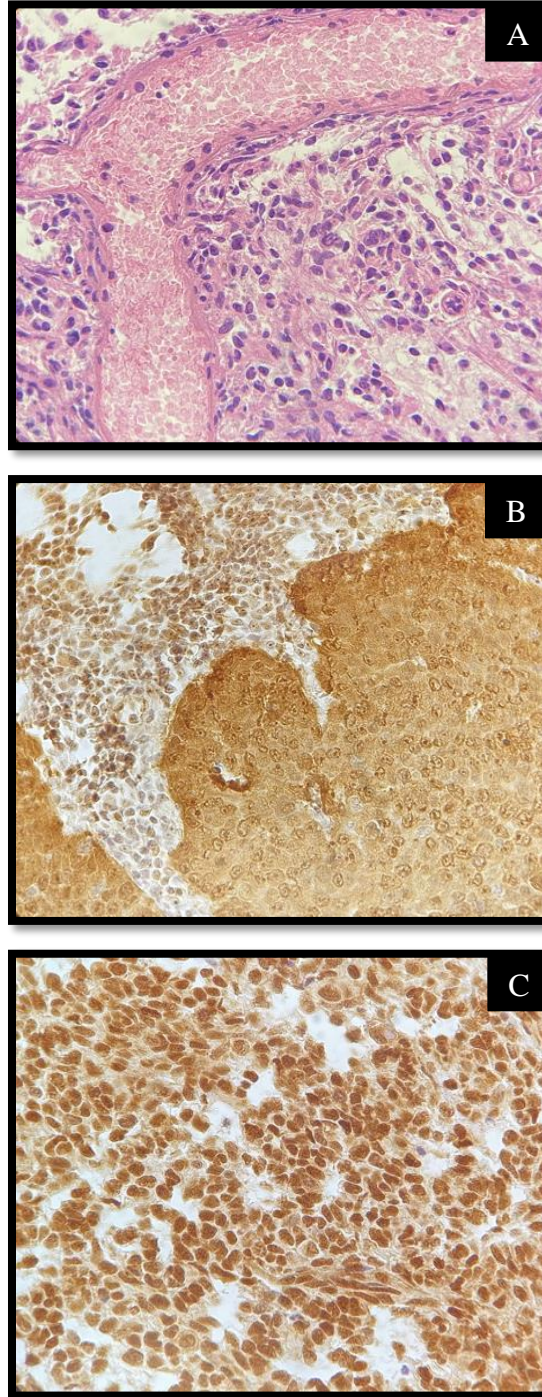


Figura 9. Tinción IHQ para p16^{INK4a} en GBM del paciente No. 17. **A)** Tinción del tumor con hematoxilina y eosina. **B)** Expresión de p16^{INK4a} por IHQ en tumor de cervix. **C)** Expresión positiva alta (>75 % de núcleos teñidos) de p16^{INK4a} por IHQ en GBM.

7.4 Evaluación de la expresión de p16^{INK4a} con respecto a las características clínico-histopatológicas de los pacientes con GBM.

Se realizaron tinciones IHQ a partir de cortes histológicos de 58 glioblastomas multiformes y de estos, 49 (84.5%) fueron positivos a la expresión de p16^{INK4a}. Un total de 20 (87%) casos positivos a la expresión de p16^{INK4a} pertenecían al grupo de edad de >60 años y 26 (83.9%) eran del sexo masculino. La supervivencia menor a 12 meses presentó una mayor expresión en 36 (85.7%) pacientes. El principal sitio de localización del tumor con mayor expresión de p16^{INK4a} fue el HCD con un total de 26 (81.2%) casos. La expresión positiva fue predominante en las muestras con una resección quirúrgica parcial del tumor con 25 (92.6%) casos. En 21 (87.5%) muestras con expresión positiva de p16^{INK4a} se presentó una recidiva del tumor. Según la escala de ECOG, la expresión fue predominante en la escala 4 con 19 (82.6%) casos positivos. Del total de los pacientes con GBM con expresión positiva de p16^{INK4a}, 24 (85.7%) no recibieron algún tratamiento. Sin embargo, no se encontró alguna diferencia estadísticamente significativa entre la expresión de p16^{INK4a} y las características clínico-histopatológicas ($p < 0.05$) (**Tabla 5**).

Tabla 5. Evaluación de la expresión de p16^{INK4a} con respecto a las características clínico-histopatológicas de 58 pacientes con GBM.

	Total (n=58)	Expresión de p16 ^{INK4a}		p
		Negativa ^a (n=9)	Positiva ^b (n=49)	
Edad (años)	56.5 (6-83)	55 (37-75)	56 (6-83)	0.906
≥60 años	23 (39.7%)	3 (13%)	20 (87%)	0.673
Genero				0.890
Masculino	31 (53.4%)	5 (16.1%)	26 (83.9%)	
Femenino	27 (46.6%)	4 (14.8%)	23 (85.2%)	
Supervivencia				0.679
≥12 meses	16 (27.6%)	3 (18.8%)	13 (81.2%)	
<12 meses	42 (72.4%)	6 (14.3%)	36 (85.7%)	
Localización				0.505
HCD	32 (55.1%)	6 (18.8%)	26 (81.2%)	
HCI	23 (39.7%)	3 (13%)	20 (87%)	
LM	3 (5.2%)	-	3 (100%)	
Resección quirúrgica				0.207
Total	6 (10.3%)	2 (33.3%)	4 (66.7%)	
Subtotal	25 (43.1%)	5 (20%)	20 (80%)	
Parcial	27 (46.6%)	2 (7.4%)	25 (92.6%)	
Recidiva				0.509
Si	24 (41.4%)	3 (12.5%)	21 (87.5%)	
No	34 (58.6%)	6 (17.6%)	28 (82.4%)	
ECOG				0.479
0 ^c	-	-	-	
1 ^d	13 (22.4%)	3 (23.1%)	10 (76.9%)	
2 ^e	6 (10.3%)	-	6 (100%)	
3 ^f	16 (27.6%)	2 (12.5%)	14 (87.5%)	
4 ^g	23 (39.7%)	4 (17.4%)	19 (82.6%)	
5 ^h	-	-	-	
Tratamiento				0.257
QT	3 (5.2%)	-	3 (100%)	
RT	6 (10.3%)	-	6 (100%)	
Ambas	21 (36.2%)	5 (23.8%)	16 (76.2%)	
Ninguna	28 (48.3%)	4 (12.3%)	24 (85.7%)	

Los valores se muestran en frecuencias absolutas (porcentaje). La edad es presentada como mediana (rango).

^a < del 25% de células teñidas.

^b ≥ del 25% de células teñidas.

Los pacientes:

^c Se encuentran asintomáticos, son capaz de realizar un trabajo y actividades normales.

^d Presentan síntomas que le impiden realizar trabajos, se desempeña normalmente en sus actividades.

^e No son capaz de desempeñar ningún trabajo, y con síntomas que le obligan a permanecer en la cama.

^f Estan en cama más de la mitad del día. Necesitan ayuda para la mayoría de las actividades.

^g Permanecen encamados y necesitan ayuda para todas las actividades de la vida diaria.

^h Fallecieron.

7.5 Analisis de los niveles de expresión positiva de p16^{INK4a} con respecto a las características clínico-histopatológicas de los pacientes.

Al evaluar las tinciones IHQ de cortes histológicos de 49 GBM con expresión positiva de p16^{INK4a}, se agruparon en expresión baja, moderada y alta, según el nivel de expresión de cada tumor. Del total de los casos, 8 (16.3%) tuvieron una expresión positiva baja, 8 (16.3%) moderada y 33 (67.4%) alta. La expresión positiva alta fue predominante en el grupo de edad >60 años con 8 (40%) de los casos, así como en el grupo del género masculino con 18 (69.2%) muestras. La mayoría de los pacientes con una supervivencia menor a 12 meses tuvieron una expresión alta de p16^{INK4a}, con 24 (66.6%) casos. Los principales sitios de localización del tumor con expresión alta fueron HCD y HCI con 16 (61.5%) y 16 (80.0%) casos, respectivamente. La resección quirúrgica parcial del tumor tuvo una predominante expresión alta en 17 (68.0%) casos. 15 (71.4%) pacientes con recidiva del tumor tuvieron una expresión alta. De los pacientes con expresión alta de p16^{INK4a}, 11 (78.6%) y 11 (57.8%) pacientes se categorizaron según la escala de ECOG 3 y 4, respectivamente. La mayoría de los pacientes con expresión alta recibieron algún tratamiento, 3 (100.0%) recibieron QT, 5 (83.3%) RT y 10 (62.6%) recibieron ambas. Se encontró una diferencia significativa entre la edad y los niveles de expresión positiva de p16^{INK4a} ($p = 0.014$). Sin embargo, no se encontró alguna diferencia significativamente estadística entre alguna característica clínico-histología y los niveles de expresión positiva de p16^{INK4a} ($p < 0.05$) (**Tabla 6**).

Tabla 6. Características clínico-histopatológicas y niveles de expresión de p16^{INK4a} en 58 pacientes con GBM.

	Total (n=49)	Nivel de expresión positiva de p16 ^{INK4a}			P
		Baja ^a (n=8)	Moderada ^b (n=8)	Alta ^c (n=33)	
Edad	56 (6-83)	56.5 (40-76)	54.5 (15-83)	55 (6-78)	0.014
>60 años	20 (40.8%)	7 (35.0%)	5 (25.0%)	8 (40.0%)	0.670
Genero					0.891
Masculino	26 (56.1%)	4 (15.4%)	4 (15.4%)	18 (69.2%)	
Femenino	23 (46.9%)	4 (17.4%)	4 (17.4%)	15 (65.2%)	
Supervivencia					0.679
>12 meses	13 (26.5%)	2 (15.4%)	2 (15.4%)	9 (69.2%)	
<12 meses	36 (73.5%)	6 (16.7%)	6 (16.7%)	24 (66.6%)	
Localización					0.505
HCD	26 (56.1%)	4 (15.4%)	6 (23.1%)	16 (61.5%)	
HCI	20 (40.8%)	3 (15.0%)	1 (5.0%)	16 (80.0%)	
LM	3 (6.1%)	1 (33.3%)	1 (33.3%)	1 (33.3%)	
Resección quirúrgica					0.207
Total	4 (8.2%)	-	2 (50.0%)	2 (50.0%)	
Subtotal	20 (40.8%)	3 (15.0%)	3 (15.0%)	14 (70.0%)	
Parcial	25 (51.0%)	5 (20.0%)	3 (12.0%)	17 (68.0%)	
Recidiva					0.509
Si	21 (42.9%)	3 (14.3%)	3 (14.3%)	15 (71.4%)	
No	28 (57.1%)	5 (17.9%)	5 (17.9%)	18 (64.2%)	
ECOG					0.439
0 ^d	-	-	-	-	
1 ^e	10 (20.4%)	1 (10.0%)	2 (20.0%)	7 (70.0%)	
2 ^f	6 (12.2%)	1 (16.7%)	1 (16.7%)	4 (66.6%)	
3 ^g	14 (28.6%)	2 (14.3%)	1 (7.1%)	11 (78.6%)	
4 ^h	19 (38.8%)	4 (21.1%)	4 (21.1%)	11 (57.8%)	
5 ⁱ	-	-	-	-	
Tratamiento					0.257
QT	3 (6.1%)	-	-	3 (100%)	
RT	6 (12.2%)	1 (16.7%)	-	5 (83.3%)	
Ambas	16 (32.7%)	3 (18.7%)	3 (18.7%)	10 (62.6%)	
Ninguna	24 (49.0%)	4 (16.7%)	5 (20.8%)	15 (62.5%)	

Los valores se muestran en frecuencias absolutas (porcentaje). La edad es presentada como mediana (rango).

^a Del 25 - 49% de células teñidas.

^b Del 50 - 75% de células teñidas.

^c > del 75% de células teñidas.

Los pacientes:

^d Se encuentran asintomáticos, son capaz de realizar un trabajo y actividades normales.

^e Presentan síntomas que le impiden realizar trabajos, se desempeña normalmente en sus actividades.

^f No son capaz de desempeñar ningún trabajo, y con síntomas que le obligan a permanecer en la cama.

^g Están en cama más de la mitad del día. Necesitan ayuda para la mayoría de las actividades.

^h Permanecen encamados y necesitan ayuda para todas las actividades de la vida diaria.

ⁱ Fallecieron.

7.6 Análisis de supervivencia con respecto a la expresión de p16^{INK4a} en glioblastoma multiforme.

Al evaluar los resultados de la expresión de p16^{INK4a} en los GBM con respecto a la supervivencia de los 58 pacientes a 15 meses, se observó que los pacientes con una expresión negativa de p16^{INK4a} tuvieron una disminución en la supervivencia. Al igual que los pacientes con expresión negativa, en la supervivencia a 15 meses de los pacientes con diferentes niveles de expresión de p16^{INK4a} no se observó una diferencia estadísticamente significativa (*Log Rank* < 0.05) (**Figura 10**).

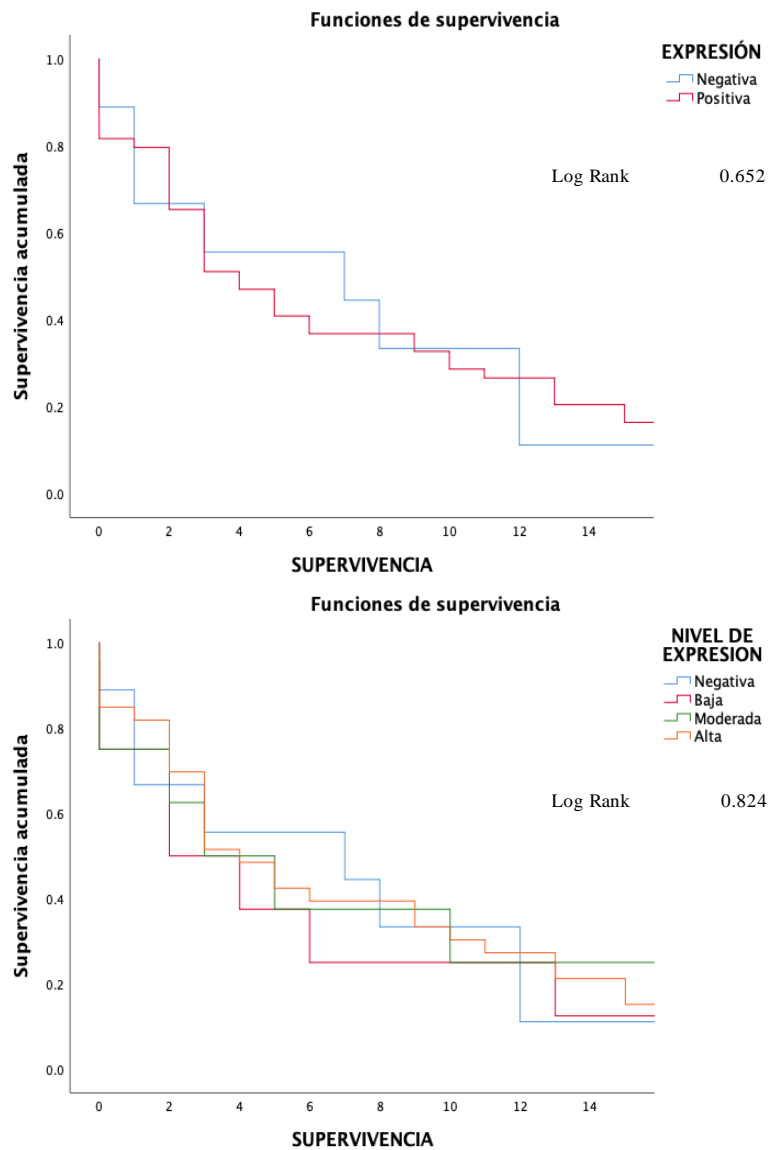


Figura 10. Análisis de supervivencia a 15 meses con respecto a la expresión de p16^{INK4a} en pacientes con GBM.

7.7 Evaluación del perfil de metilaciones en el promotor de p16^{INK4a} con respecto a las características clinico-histopatologica de pacientes con GBM.

Se realizó un perfil de metilación de la región promotora del gen de p16^{INK4a} mediante MSP, los resultados obtenidos se agruparon en casos metilados y no metilados. De los 48 casos estudiados, 26 (54.2%) pertenecieron a los metilados y 22 (45.8%) a los no metilados. De ambos grupos, 9 (50% / 50%) pacientes pertenecían al grupo de edad de mayores de 60 años. El género masculino tuvo una mayor cantidad de muestras metiladas (61.5%). Se observó similitud en la cantidad de pacientes con una supervivencia <12 meses que presentaban la metilación (48.5%) y la no metilación (51.5%) del promotor de p16^{INK4a}. Las muestras con p16^{INK4a} metilado se localizaban principalmente en el hemisferio central izquierdo (HCI) con 13 (56.5%) casos, y solo 5 (83.3%) pacientes tuvieron una resección quirúrgica total del tumor. Del total, 12 (63.2%) pacientes con el promotor de p16^{INK4a} metilado presentaron recidiva del tumor. De los pacientes con el promotor metilado de p16^{INK4a}, 8 (53.3%) se encontraban en la escala de ECOG 4. El 60.0% de los casos metilados obtuvieron algún tratamiento de quimioterapia (QT) y/o radioterapia (RT). No se encontró una diferencia significativa entre las características clinico-histopatológicas y el estado de metilación de las muestras de GBM ($p < 0.05$) (**Tabla 7**).

Tabla 7. Características clínico-histopatológicas y estado de metilación de p16^{INK4a} en 48 pacientes con GBM.

	Total (n=48)	Estado de metilación de p16 ^{INK4a}		p
		Metilado (n=26)	No metilado (n=22)	
Edad	56 (7-83)	56 (7-83)	55 (11-78)	0.203
>60 años	18 (37.5%)	9 (50.0%)	9 (50.0%)	0.772
Genero				0.395
Masculino	26 (54.2%)	16 (61.5%)	10 (38.5%)	
Femenino	22 (45.8%)	10 (45.5%)	12 (54.5%)	
Supervivencia				0.224
≥12 meses	15 (31.2%)	10 (66.7%)	5 (33.3%)	
<12 meses	33 (68.8%)	16 (48.5%)	17 (51.5%)	
Localización				0.958
HCD	23 (47.9%)	12 (52.2%)	11 (47.8%)	
HCI	23 (47.9%)	13 (56.5%)	10 (43.8%)	
LM	2 (4.2%)	1 (50.0%)	1 (50.0%)	
Resección quirúrgica				0.525
Total	6 (12.5%)	5 (83.3%)	1 (16.7%)	
Subtotal	18 (37.5%)	9 (50.0%)	9 (50.0%)	
Parcial	24 (50.0%)	12 (50.0%)	12 (50.0%)	
Recidiva				0.399
Si	19 (39.6%)	12 (63.2%)	7 (36.8%)	
No	29 (60.4%)	14 (48.3%)	15 (51.7%)	
ECOG				0.791
0 ^a	1 (2.1%)	1 (100.0%)	-	
1 ^b	12 (25%)	7 (58.3%)	5 (41.7%)	
2 ^c	6 (12.5%)	3 (50.0%)	3 (50.0%)	
3 ^d	14 (29.2%)	7 (50.0%)	7 (50.0%)	
4 ^e	15 (31.2%)	8 (53.3%)	7 (46.7%)	
5 ^f	-	-	-	
Tratamiento				0.168
QT	2 (4.2%)	2 (100.0%)	-	
RT	5 (10.4%)	1 (20.0%)	4 (80.0%)	
Ambas	20 (41.7%)	12 (60.0%)	8 (40.0%)	
Ninguna	21 (43.7%)	11 (52.4%)	10 (47.6%)	

Los valores se muestran en frecuencias absolutas (porcentaje). La edad es presentada como mediana (rango). Los pacientes:

^a Se encuentran asintomáticos, son capaz de realizar un trabajo y actividades normales.

^b Presentan síntomas que le impiden realizar trabajos, se desempeña normalmente en sus actividades.

^c No son capaz de desempeñar ningún trabajo, y con síntomas que le obligan a permanecer en la cama.

^d Estan en cama más de la mitad del día. Necesitan ayuda para la mayoría de las actividades.

^e Permanecen encamados y necesitan ayuda para todas las actividades de la vida diaria.

^f Fallecieron.

7.8 Análisis de supervivencia con respecto al estado de metilación de p16^{INK4a} en glioblastoma multiforme.

Se evaluarón los resultados del estado de metilación del promotor de p16^{INK4a} en los GBM con respecto a la supervivencia 15 meses de 48 pacientes, se observó que los pacientes con el promotor de p16^{INK4a} no metilado tuvieron una mayor disminución en la supervivencia. Se encontró una diferencia estadística significativa entre el estado de metilación de las muestras y la supervivencia de los pacientes (*Log Rank* = 0.038) (**Figura 11**).

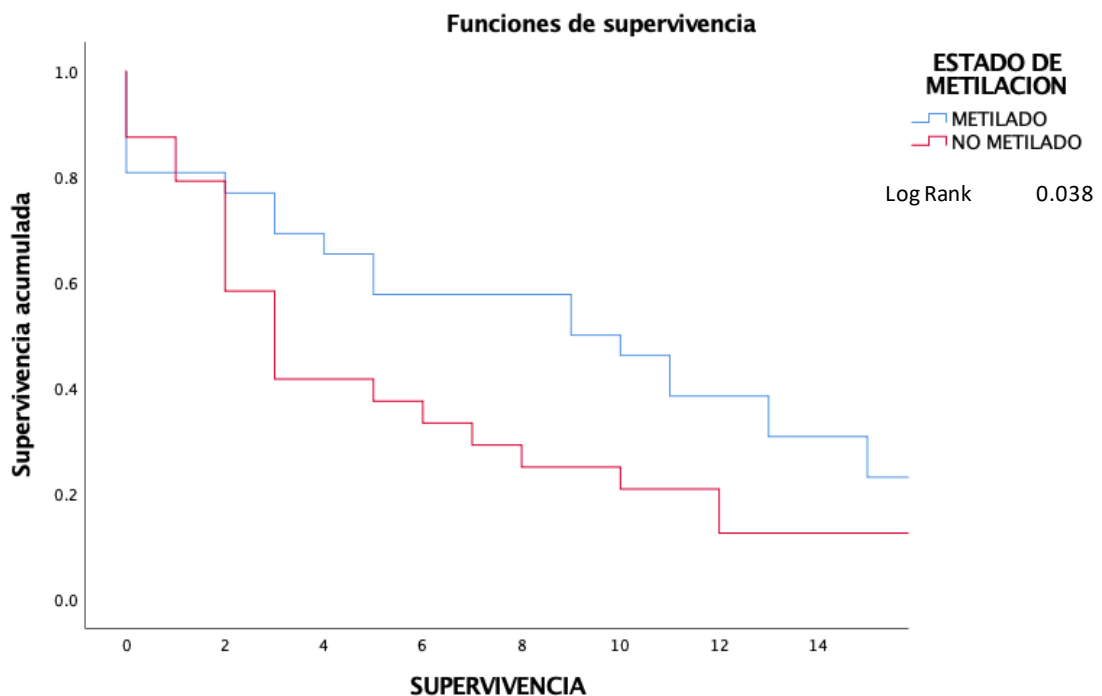


Figura 11. Análisis de supervivencia a 15 meses con respecto al estado de metilación del promotor de p16^{INK4a} en 48 pacientes con GBM.

7.9 Análisis del estado de metilación del promotor en GBM y la expresión de p16^{INK4a}.

Al evaluar los resultados del estado de metilación de 45 muestras de GBM con respecto a la expresión de p16^{INK4a}, se observó que la expresión positiva de p16^{INK4a} fue predominante en las muestras metiladas con 22 (96.7%) de los casos. Se encontró una diferencia estadística significativa entre el estado de metilación y la expresión de p16^{INK4a} (*p* = 0.017) (**Tabla 8**).

Tabla 8. Estado de metilación de 45 pacientes con GBM y su relación con la expresión de p16^{INK4a}.

	Total (n=45)	Expresión de p16^{INK4a}		<i>p</i>
		Positiva^a (n=38)	Negativa^b (n=7)	
Estado de metilación				0.017
Metilado	23 (51.1%)	22 (96.7%)	1 (4.3%)	
No metilado	22 (48.9%)	16 (72.7%)	6 (27.3%)	

^a ≥ del 25% de células teñidas

^b < del 25% de células teñidas.

8. DISCUSIÓN

El glioblastoma multiforme (GBM) es el glioma difuso más agresivo y es el tumor maligno primario del sistema nervioso central (SNC) más común y de peor pronóstico, ya que solo un 33% de los pacientes sobreviven más de un año mientras que menos del 5% logran vivir más de 5 años (Castañeda et al., 2015; Urbańska et al., 2014). La causa específica del GBM aún es desconocida, sin embargo, se ha puesto cada vez más énfasis en una etiología viral. El Virus de Epstein-Barr (VEB) ha sido ampliamente asociado con el desarrollo de tumores en humanos y, mientras algunos estudios lo han reportado en GBM con una prevalencia del 90% de los casos, existen otros que no lo han detectado, por lo que una asociación entre el VEB y GBM aún es controversial (Akhtar et al., 2018). Además, existen anormalidades moleculares que pueden conducir a la gliomagenesis; se ha visto, por ejemplo, que la delección/mutación/metilación de p16^{INK4a} puede contribuir al desarrollo de GBM por lo que la causa molecular exacta de GBM es aun difícil de descifrar (Crespo et al., 2015).

En el presente estudio se incluyeron un total de 61 muestras de tejido tumoral cerebral correspondientes a pacientes con diagnóstico de GBM que se encontraban en un rango de edad de 6 a 83 años, con una mediana de 56.5 años y en su mayoría del sexo masculino (55.7%), al igual que en la literatura consultada de diferentes estudios epidemiológicos, la mayoría de los casos eran hombres en un rango de 13 a 68 años con una mediana de 48.0 años (Zhang et al., 2016). La mayoría de los casos se presentaban en el grupo de edad de menores de 60 (59.0%), en la literatura se observó que la mayoría de los casos de GBM se presentaban en el grupo de edad de ≥ 61 (57.3%) (Stark et al., 2012). Se observó una media de supervivencia de 12.9 meses, similar a lo encontrado por Thakkar y colaboradores, donde encontraron una media de supervivencia de 11.4 meses (Thakkar et al. 2014). Se encontró que la principal localización del tumor fue en el hemisferio central derecho (HCD) del cerebro (53.2%), similares resultados fueron observados por Larjavaara, donde el sitio de localización más frecuente fue en el HCD (Larjavaara et al., 2005). La mayoría de los tumores obtenidos fueron a partir de una resección quirúrgica parcial (47.5%), seguido y por poca diferencia de la resección subtotal, resultados clínicos diferentes fueron presentados por Zhang y colaboradores, donde observaron que la mayoría de los tumores fueron a partir de resecciones quirúrgicas

totales (70.0%) (Zhang et al., 2016). Se observó una recurrencia del tumor en el 39.3% de los pacientes, sin embargo, diferentes resultados fueron encontrados en la literatura, se observó una recurrencia del tumor en el 90% de los pacientes (Roy et al., 2015). En cuanto a la calidad de vida del paciente se midió en una escala conocida como Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG), la cual se basa en las capacidades del paciente en su vida diaria manteniendo al máximo su autonomía y se agrupa en una escala del 0-5, (Cruz & Acevedo, 2014). Lee y colaboradores observaron que el estado de la mayoría de los pacientes se encontraban en la agrupación de ECOG 0-1 (59.2%) (Lee et al., 2018), sin embargo, en nuestros resultados la mayoría de los pacientes pertenecían a ECOG 4 (39.3%), a pesar de no haberlos agrupado de igual manera, tratando de asemejar los resultados, estos no son similares ya que solo el 22.9% de nuestros pacientes se agrupaban en ECOG 0-1. En cuanto a el tratamiento a los pacientes, se observó el 52.4% de los pacientes recibieron QT (4.9%) o RT (9.8%) y/o ambas (37.7%), en la literatura se encontraron resultados diferentes, Zhang y colaboradores mencionan que el 100.0% de sus pacientes recibieron QT y/o RT, (Zhang et al., 2016); Ma y colaboradores mencionan que el 94.1% recibió algún tratamiento (Ma et al., 2009).

La infección por el VEB ha sido ampliamente asociada con la oncogénesis de ciertos tipos de tumores, en GBM, estos resultados han sido controversiales, debido a que en alguna variedad de estudios muestras su presencia en el total de las muestras o su ausencia completa (Akhtar et al., 2018), en este estudio, se encontró una prevalencia del 0% (00/62) del VEB en las muestras analizadas. Resultados similares fueron hallados por Hashida et al., donde observaron una prevalencia del 0% (00/39) del VEB en gliomas de alto grado (Hashida et al. 2015); Fonseca et al., observó la presencia del virus de Epstein-Barr en solo el 1.3% (1/75) de muestras de GMB (Fonseca et al. 2015); una prevalencia un poco más alta fue encontrada por Leibovitch et al., encontraron que el 21% (04/19) de los gliomas de alto grado fueron positivos a la presencia de ADN del VEB (Leibovitch et al. 2016). Contrariamente a estos resultados, Poltermann et al., encontró que el 90% de los gliomas de alto grado presentaban positividad para el VEB (Poltermann et al. 2006). Una de las principales diferencias en estos estudios realizados, además del tipo de técnica con la que se realizó, es el tipo de muestra al que realizó la detección, los especímenes que mostraron una baja prevalencia del VEB la detección de este fue a partir de muestras

de tejido tumoral, en cuanto al estudio con una prevalencia alta, fue a partir de suero obtenido de pacientes con diagnóstico clínico de GBM, esto puede ser una de las razones por las que hay una gran y controversial diferencia entre los resultados.

p16^{INK4a} es considerada una proteína de supresión tumoral, que actúa en la regulación negativa del ciclo celular, su expresión se encuentra desregulada en una gran cantidad de neoplasias malignas (Puduvalli et al., 2000; Romagosa et al., 2011). En el presente estudio se determinó la expresión de p16^{INK4a} en 58 muestras con diagnóstico de GBM, se encontró que 49 (84.5%) casos fueron positivos a la expresión de p16^{INK4a}, sin embargo, se encontraron diferentes resultados en literatura, Newcomb y colaboradores al evaluar la expresión de p16^{INK4a} encontraron que 51/95 (53.7%) pacientes con GBM mostraron expresión positiva (Newcomb et al., 1998); Gao y colaboradores encontraron que la expresión de p16^{INK4a} fue positiva en 29/62 (46.7%) gliomas (Gao, Li & Song, 2015); Cui y colaboradores observaron que la expresión de p16^{INK4a} fue positiva en 19/48 (39.8%) casos (Cui et al., 2005); Rao y colaboradores evaluaron la expresión de p16^{INK4a} astrocitomas y encontraron que 26/37 (70.3%) presentaron expresión positiva (Rao, Miller & Newcomb, 1997). Los controversiales resultados pueden deberse a las diferentes consideraciones del porcentaje de expresión de p16^{INK4a} con base en el grado de tinción nuclear. Con respecto a las características clínico-histopatológicas de los pacientes, un total de 20 (87%) pacientes pertenecían al grupo de edad de mayores de 60 y 26 (83.9%) eran del sexo masculino p16^{INK4a}, sin embargo, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), resultados diferentes fueron encontrados por Gao y colaboradores, la mayoría de los pacientes con expresión positiva de p16^{INK4a} pertenecían al grupo de edad de menores de 60 (48.5%) y la mayoría eran hombres (46%), pero al igual que en nuestro estudio, no se encontraron una diferencia significativa ($p < 0.05$), (Gao, Li & Song, 2015). Los 49 (84.5%) casos positivos de expresión de p16^{INK4a} se agruparon en expresión baja, moderada y alta, según el grado de expresión nuclear de cada tumor. Del total de los casos, se encontró que 8 (16.3%) tuvieron una expresión positiva baja, 8 (16.3%) expresión positiva moderada y 33 (67.4%) expresión positiva alta. En diversos estudios al igual que en este, se dividieron en diferentes grupos de acuerdo a el grado de expresión nuclear, sin embargo, estos no presentan los resultados de tal manera (Newcomb et al., 1998; Park et al., 2021; Zolota et al., 2008). En cuanto a

la sobrevida de los pacientes y su relación con la expresión de p16^{INK4a}, aun que se observó que los pacientes con expresión negativa de p16^{INK4a} tuvieron una ligera disminución en la supervivencia. La supervivencia con respecto a los diferentes niveles de expresión positiva (baja, moderada y alta), al igual que con la de los pacientes con expresión negativa, no se observó diferencia estadísticamente significativa (*Log Rank* = 0.652/0.824, respectivamente). Por otro lado, Park y colaboradores al evaluar en 326 gliomas, encontraron que la expresión de p16 se relacionó significativamente con una supervivencia baja ($p < .001$) (Park et al., 2021).

En cánceres humanos, la inactivación o la pérdida de expresión de p16^{INK4a} se ha visto que es debido a la metilación en las islas CpG del promotor del gen de p16^{INK4a} (Luo et al., 2006; Wakabayashi et al., 2009). Se determinó el estado de metilación del promotor de p16^{INK4a} de 48 muestras, de las cuales 26 (54.2%) eran metilados y 22 (45.8%) no metilados. Según la literatura consultada, resultados controversiales han sido observados, Fan y colaboradores solo encontraron 2/22 (9%) GBM con hipermetilación en el promotor de p16^{INK4a} (Fan et al., 2002); por otra parte, resultados similares fueron publicados por Weaver y colaboradores, encontraron que 12/20 (60%) muestras de tumores astrocíticos presentaban la metilación del promotor de p16 (Weaver et al., 2006); Park y colaboradores observaron que 5/10 (50%) gliomas presentaban metilación en el promotor de p16^{INK4a} (Park et al., 2000). En cuanto a la asociación entre la supervivencia y el estado de metilación del promotor de p16^{INK4a}, en este estudio se observó una asociación estadísticamente significativa entre los pacientes con el promotor de p16^{INK4a} no metilado y la baja supervivencia (*Log Rank* = 0.038). Resultados diferentes fueron encontrados en la literatura consultada, Liu y colaboradores observaron que la hipermetilación del promotor de p16^{INK4a} se asociara con la supervivencia de los pacientes ($p < 0.005$) (Liu et al., 2010). Por otro lado, en un estudio realizado por Sippl no se pudo realizar una asociación estadística debido a que ningún astrocitoma presentaba metilación en el promotor de p16^{INK4a} (Sippl et al., 2018).

En este estudio, se observó que la expresión de p16^{INK4a} fue positiva en 22/45 (96.7%) de casos de GBM con el promotor de p16^{INK4a} metilado, y se encontró una diferencia significativa entre la expresión de p16^{INK4a} y el estado de metilación ($p = 0.017$). Resultados similares fueron encontrados por Park y colaboradores, donde

encontraron una asociación estadística significativa entre la expresión de p16^{INK4a} y el estado de metilación de este ($p = 0.017$) (Park et al., 2000).

9. CONCLUSIÓN

1. Las características clínico-histopatológicas de los pacientes con diagnóstico clínico de glioblastoma multiforme de la unidad médica de tercer nivel de atención del noreste de México que fueron analizadas son similares a las que concuerdan reportadas en la literatura consultada de este padecimiento.

2. No se encontró una asociación significativa entre la expresión de p16^{INK4a} y las características clínico-histopatológicas y la supervivencia de los pacientes con GBM.

3. No se encontró una asociación significativa entre los niveles de expresión positiva de p16^{INK4a} y las características clínico-histopatológicas y la supervivencia de los pacientes con GBM.

4. No se encontró una diferencia estadística significativa entre el estado de metilación y las características clínico-histopatológicas de los pacientes con GBM.

5. Se encontró una diferencia significativa entre el estado de metilación del promotor de p16^{INK4a} y la supervivencia de los pacientes.

6. Se encontró una diferencia significativa entre el estado de metilación del promotor de p16^{INK4a} y la expresión de p16^{INK4a} de los pacientes.

10. PERSPECTIVAS

1. Detectar el Virus de Epstein-Barr mediante otras técnicas, como secuenciación, inmunohistoquímica, FISH, esto debido a la sensibilidad de las técnicas y a que en diversos estudios se realizan varias técnicas para la detección del virus.

2. Continuar con la búsqueda de metilaciones, esto debido a la falta de tiempo y recursos, es por eso que la n de la evaluación del estado de metilación solo fueron 48 muestras.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Akhtar S, Vranic S, Cyprian FS, & Al Moustafa A E. 2018. Epstein-Barr Virus in Gliomas: Cause, Association, or Artifact?. *Frontiers in oncology* 8:123.
2. Alegría-Loyola M A, Galnares-Olalde J A, & Mercado M. 2017. Tumors of the central nervous system. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social* 55(3):330-340.
3. Anaya-Delgadillo, G., de Juambelz-Cisneros, P. P., Fernández-Alvarado, B., Pazos-Gómez, F., Velasco-Torre, A., & Revuelta-Gutiérrez, R. (2016). Prevalencia de tumores del sistema nervioso central y su identificación histológica en pacientes operados: 20 años de experiencia. *Cirugía y Cirujanos*, 84(6), 447-453.
4. Bo-Lin Liu, Jin-Xiang Cheng, Wei Zhang, Xiang Zhang, Rui Wang, Hong Lin, Jun-Li Huo, Hong Cheng, Quantitative detection of multiple gene promoter hypermethylation in tumor tissue, serum, and cerebrospinal fluid predicts prognosis of malignant gliomas, *Neuro-Oncology*, Volume 12, Issue 6, June 2010, Pages 540–548.
5. Castañeda, Carlos A, Casavilca, Sandro, Orrego, Enrique, García-Corrochano, Pamela, Deza, Pedro, Heinike, Hugo, Castillo, Miluska, Belmar-Lopez, Carolina, & Ojeda, Luis. (2015). Glioblastoma: Análisis molecular y sus implicancias clínicas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 32(2), 316-325.
6. Costello, J. F., Berger, M. S., Huang, H. S., & Cavenee, W. K. (1996). Silencing of p16/CDKN2 expression in human gliomas by methylation and chromatin condensation. *Cancer research*, 56(10), 2405-2410.
7. Cruz P, Acevedo F. 2014. Escalas de estado funcional (o performance status) en cáncer. *Gastroenterol latinoam.* 25(3):219-226.
8. Cui, W., Wu, R., Cao, H., Gao, J., Wang, X., & Ren, Q. (2005). P53 gene mutation and expression of MDM2, P53, P16 protein and their relationship in human glioma. *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical sciences = Hua zhong ke ji da xue xue bao. Yi xue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao. Yixue Yingdewen ban*, 25(6), 622–635.
9. Davis M. E. (2016). Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *Clinical journal of oncology nursing*, 20(5 Suppl), S2–S8.
10. De Vleeschouwer, S. (2017). Epidemiology and Outcome of Glioblastoma-

Glioblastoma.

11. Demokan, S., & Dalay, N. (2011). Role of DNA methylation in head and neck cancer. *Clinical epigenetics*, 2(2), 123-50.
12. El-Naggar, A. K., & Westra, W. H. (2012). p16 expression as a surrogate marker for HPV-related oropharyngeal carcinoma: A guide for interpretative relevance and consistency. *Head & Neck*, 34(4), 459-461.
13. Fan, X., Muñoz, J., Sanko, S. G., & Castresana, J. S. (2002). PTEN, DMBT1, and p16 alterations in diffusely infiltrating astrocytomas. *International journal of oncology*, 21(3), 667–674.
14. Farrell, P. J. (2019). Epstein–Barr virus and cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*.
15. Fonseca et al. 2015 (Fonseca, R. F., Rosas, S. L. B., Oliveira, J. A., Teixeira, A., Alves, G., & Carvalho, M. D. G. C. (2015). Frequency of Epstein-Barr virus DNA sequences in human gliomas. *Sao Paulo Medical Journal*, 133(1), 51-54.)
16. Gao, Y., Li, L., & Song, L. (2015). Expression of p16 and Survivin in gliomas and their correlation with cell proliferation. *Oncology letters*, 10(1), 301–306.
17. García, J. F., Villuendas, R., Algara, P., Sáez, A. I., Sánchez-Verde, L., Martínez-Montero, J. C., Martínez, P., & Piris, M. A. (1999). Loss of p16 protein expression associated with methylation of the p16INK4A gene is a frequent finding in Hodgkin's disease. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 79(12), 1453–1459.
18. Habberstad, A. H., Lind-Landstöm, T., & Torp, S. H. (2012). The histopathological spectrum of primary human glioblastomas with relations to tumour biology. *J Clin Exp Pathol*, 2, 110.
19. Hanif, F., Muzaffar, K., Perveen, K., Malhi, S. M., & Simjee, S. (2017). Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 18(1), 3–9.
20. Hashida, Y., Taniguchi, A., Yawata, T., Hosokawa, S., Murakami, M., Hiroi, M., ... & Daibata, M. (2015). Prevalence of human cytomegalovirus, polyomaviruses, and oncogenic viruses in glioblastoma among Japanese subjects. *Infectious agents and*

cancer, 10(1), 1-9).

21. Jäkel, S., & Dimou, L. (2017). Glial cells and their function in the adult brain: a journey through the history of their ablation. *Frontiers in cellular neuroscience*, 11, 24.
22. Jin, B., Li, Y., & Robertson, K. D. (2011). DNA methylation: superior or subordinate in the epigenetic hierarchy?. *Genes & cancer*, 2(6), 607–617.
23. Kakshapati, T., Basnet, R. B., Pant, B., & Gautam, D. (2018). Histopathological analysis of central nervous system tumor; an observational study. *Journal of Pathology of Nepal*, 8(2), 1393-1398.
24. Kung, C. P., Meckes, D. G., Jr, & Raab-Traub, N. (2011). Epstein-Barr virus LMP1 activates EGFR, STAT3, and ERK through effects on PKCdelta. *Journal of virology*, 85(9), 4399–4408.
25. Kyle D. Weaver, Stuart A. Grossman & James G. Herman. (2006). Methylated Tumor-Specific DNA as a Plasma Biomarker in Patients with Glioma, *Cancer Investigation*, 24:1, 35-40.
26. Lahera, T. & González, O. (2010). El receptor del factor de crecimiento epidérmico y su papel en el desarrollo tumoral. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 9(2), 172-180.
27. Lam, P. Y., Di Tomaso, E., Ng, H. K., Pang, J. C., Roussel, M. F., & Hjelm, N. M. (2000). Expression of p19INK4d, CDK4, CDK6 in glioblastoma multiforme. *British journal of neurosurgery*, 14(1), 28–32.
28. Leibovitch et al. 2016 (Leibovitch, E. C., Almira-Suarez, M. I., & Jacobson, S. (2016). Human herpesvirus multiplex ddPCR detection in brain tissue from low-and high-grade astrocytoma cases and controls. *Infectious agents and cancer*, 11(1), 1-10.)
29. Limam, S., Missaoui, N., Mestiri, S., Yacoubi, M. T., Krifa, H., Selmi, B., & Mokni, M. (2019). Epstein-Barr virus infection in gliomas. *Current research in translational medicine*, 67(4), 129-133.
30. Lin, C. T., Leibovitch, E. C., Almira-Suarez, M. I., & Jacobson, S. (2016). Human herpesvirus multiplex ddPCR detection in brain tissue from low- and high-grade astrocytoma cases and controls. *Infectious agents and cancer*, 11, 32.
31. Luo, D., Zhang, B., Lv, L. et al. 2006. Methylation of CpG islands of p16 associated with progression of primary gastric carcinomas. *Lab Invest* 86, 591–598.

32. Ma, X., Lv, Y., Liu, J., Wang, D., Huang, Q., Wang, X., Li, G., Xu, S., & Li, X. (2009). Survival analysis of 205 patients with glioblastoma multiforme: clinical characteristics, treatment and prognosis in China. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, 16(12), 1595–1598.
33. Mehta, M., Vogelbaum, M. A., Chang, S., & Patel, N. (2011). Neoplasms of the central nervous system. *Cancer: principles and practice of oncology*, 9, 1700-49.
34. Newcomb, E. W., Cohen, H., Lee, S. R., Bhalla, S. K., Bloom, J., Hayes, R. L., & Miller, D. C. (1998). Survival of patients with glioblastoma multiforme is not influenced by altered expression of p16, p53, EGFR, MDM2 or Bcl-2 genes. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 8(4), 655–667.
35. Nishikawa, R., Furnari, F. B., Lin, H., Arap, W., Berger, M. S., Cavenee, W. K., & Huang, H. S. (1995). Loss of P16INK4 expression is frequent in high grade gliomas. *Cancer research*, 55(9), 1941-1945.
36. Omuro, A., & DeAngelis, L. M. (2013). Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. *Jama*, 310(17), 1842-1850.
37. Park, S. H., Jung, K. C., Ro, J. Y., Kang, G. H., & Khang, S. K. (2000). 5' CpG island methylation of p16 is associated with absence of p16 expression in glioblastomas. *Journal of Korean medical science*, 15(5), 555–559
38. Park, J. W., Kang, J., Lim, K. Y., Kim, H., Kim, S. I., Won, J. K., Park, C. K., & Park, S. H. (2021). The prognostic significance of p16 expression pattern in diffuse gliomas. *Journal of pathology and translational medicine*, 55(2), 102–111.
39. Patzi, A. M. C., Vázquez, A. A., & Hidalgo, C. O. (2006). Expression of p16INK4a in biopsies of the uterine cervix. Utility in the differential diagnosis between chronic reactive cervicitis, low and high grade cervical intraepithelial neoplasm and invasive carcinoma. *An Med Asoc Med Hosp ABC*. 51(2), 49-57.
40. Plata S, Laura M, Oviedo L, Julián F, & Rincón-Orozco, Bladimiro. (2018). Revisión sistemática: estrategias virales para la inducción de cáncer “virus de Epstein-Barr: latencia y mecanismos asociados a la oncogénesis viral”. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 50(3), 257-268.
41. Polterman et al 2006 (Poltermann, S., Schlehofer, B., Steindorf, K., Schnitzler, P., Geletneky, K., & Schlehofer, J. R. (2006). Lack of association of herpesviruses with

brain tumors. *Journal of neurovirology*, 12(2), 90-99.)

42. Porter, A. (2012). A Dead End: A Review of Glioblastoma Multiforme.
43. Puduvalli, V. K., Kyritsis, A. P., Hess, K. R., Bondy, M. L., Fuller, G. N., Kouraklis, G. P., Levin, V. A., & Bruner, J. M. (2000). Patterns of expression of Rb and p16 in astrocytic gliomas, and correlation with survival. *International journal of oncology*, 17(5), 963–969.
44. Purkait, S., Jha, P., Sharma, M. C., Suri, V., Sharma, M., Kale, S. S., & Sarkar, C. (2013). CDKN2A deletion in pediatric versus adult glioblastomas and predictive value of p16 immunohistochemistry. *Neuropathology*, 33(4), 405-412.
45. Rao, L. S., Miller, D. C., & Newcomb, E. W. (1997). Correlative immunohistochemistry and molecular genetic study of the inactivation of the p16INK4A genes in astrocytomas. *Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology, part B*, 6(2), 115–122.
46. Romagosa, C., Simonetti, S., López-Vicente, L., Mazo, A., Leonart, M. E., Castellvi, J., & Ramon y Cajal, S. (2011). p16(Ink4a) overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. *Oncogene*, 30(18), 2087–2097.
47. Roy, S., Lahiri, D., Maji, T., & Biswas, J. (2015). Recurrent Glioblastoma: Where we stand. *South Asian journal of cancer*, 4(4), 163–173. <https://doi.org/10.4103/2278-330X.175953> (Retraction published *South Asian J Cancer*. 2017 Oct-Dec;6(4):153).
48. Sabir, M., Baig, R. M., Ali, K., Mahjabeen, I., Saeed, M., & Kayani, M. A. (2014). Retinoblastoma (RB1) pocket domain mutations and promoter hyper-methylation in head and neck cancer. *Cellular oncology*, 37(3), 203-213.
49. Sánchez Hidalgo, N. M., González Fernández, J., Hong Lo, T., & Casasola Salas, W. (2018). Elaboración de modelo de sistema nervioso central y periférico.
50. Serrano M. 1997. The tumor suppressor protein p16INK4a. *Experimental cell research* 237(1):7-13.
51. Sibin, M. K., Bhat, D. I., Narasingarao, K. V., Lavanya, C. h., & Chetan, G. K. (2015). CDKN2A (p16) mRNA decreased expression is a marker of poor prognosis in malignant high-grade glioma. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 36(10), 7607–7614.

52. Simon, M., Simon, C., Köster, G., Hans, V. H., & Schramm, J. (2002). Conditional expression of the tumor suppressor p16 in a heterotopic glioblastoma model results in loss of pRB expression. *Journal of neuro-oncology*, 60(1), 1–12.
53. Sippl, C., Urbschat, S., Kim, Y. J., Senger, S., Oertel, J., & Ketter, R. (2018). Promoter methylation of RB1, P15, P16, and MGMT and their impact on the clinical course of pilocytic astrocytomas. *Oncology letters*, 15(2), 1600–1606.
54. Sisk, E. A., Bradford, C. R., Carey, T. E., Paulino, A., & Robertson, E. (2003). Epstein-Barr virus detected in a head and neck squamous cell carcinoma cell line derived from an immunocompromised patient. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, 129(10), 1115–1124.
55. Solomon, D. A., Kim, J. S., Jean, W., & Waldman, T. (2008). Conspirators in a capital crime: co-deletion of p18INK4c and p16INK4a/p14ARF/p15INK4b in glioblastoma multiforme. *Cancer research*, 68(21), 8657–8660.
56. Stark, A. M., van de Bergh, J., Hedderich, J., Mehdorn, H. M., & Nabavi, A. (2012). Glioblastoma: clinical characteristics, prognostic factors and survival in 492 patients. *Clinical neurology and neurosurgery*, 114(7), 840–845.
57. Tamimi, A. F., & Juweid, M. (2017). Epidemiology and outcome of glioblastoma. In *Glioblastoma [Internet]*. Codon Publications.
58. Taylor, O. G., Brzozowski, J. S., & Skelding, K. A. (2019). Glioblastoma Multiforme: An Overview of Emerging Therapeutic Targets. *Frontiers in Oncology*.
59. Thawe, N.N. (2012). Contributions of Epstein-Barr Nuclear Antigen 1 (EBNA1) and the Family of Repeats (FR) Region to oriP-mediated Replication and Segregation Functions in Nasopharyngeal Carcinoma.
60. Thompson, M. P., & Kurzrock, R. (2004). Epstein-Barr virus and cancer. *Clinical Cancer Research*, 10(3), 803–821.
61. Uribe Yunda, D. F., & Cortes Mancera, F. M. (2014). Metilación del ADN: implicaciones en carcinogénesis. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 33(1), 81–93.
62. Valenzuela, M. T., Galisteo, R., Zuluaga, A., Villalobos, M., Nunez, M. I., Oliver, F. J., & de Almodovar, J. R. (2002). Assessing the use of p16INK4a promoter gene methylation in serum for detection of bladder cancer. *European urology*, 42(6), 622–630.

63. Wakabayashi, T., Natsume, A., Hatano, H., Fujii, M., Shimato, S., Ito, M., ... & Yoshida, J. (2009). p16 promoter methylation in the serum as a basis for the molecular diagnosis of gliomas. *Neurosurgery*, 64(3), 455-462.
64. Wang et al., 2008 (Wang, C., Wu, L., Guan, L., Wang, D., Wang, Y., & Wang, Z. (2008). Hypermethylation of promoter 5' CpG island of p16 gene in glioma tissue and plasma. *The Chinese-German Journal of Clinical Oncology*, 7(4), 241-244.)
65. Witcher, M., & Emerson, B. M. (2009). Epigenetic silencing of the p16(INK4a) tumor suppressor is associated with loss of CTCF binding and a chromatin boundary. *Molecular cell*, 34(3), 271–284.
66. Wood, M. D., Halfpenny, A. M., & Moore, S. R. (2019). Applications of molecular neuro-oncology-a review of diffuse glioma integrated diagnosis and emerging molecular entities. *Diagnostic pathology*, 14(1), 29.
67. Wrensch, M., Weinberg, A., Wiencke, J., Miike, R., Barger, G., & Kelsey, K. (2001). Prevalence of antibodies to four herpesviruses among adults with glioma and controls. *American journal of epidemiology*, 154(2), 161–165. <https://doi.org/10.1093/aje/154.2.161>
68. Zavala-Vega S, Castro-Escarpulli G, Hernandez-Santos H, Salinas-Lara C, Palma I, Mejia-Arangure JM, et al. An overview of the infection of CMV, HSV 1/2 and EBV in Mexican patients with glioblastoma multiforme. *Pathol Res Pract* (2017) 213:271–6.
69. Zhang et al., 2016 (Zhang, G., Huang, S., Zhang, J., Wu, Z., Lin, S., & Wang, Y. (2016). Clinical outcome of gliosarcoma compared with glioblastoma multiforme: a clinical study in Chinese patients. *Journal of neuro-oncology*, 127(2), 355-362.)
70. Zolota, V., Tsamandas, A. C., Aroukatos, P., Panagiotopoulos, V., Maraziotis, T., Poulos, C., & Scopa, C. D. (2008). Expression of cell cycle inhibitors p21, p27, p14 and p16 in gliomas. Correlation with classic prognostic factors and patients' outcome. *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology*, 28(1), 35–42.
71. Zvonko Magić, Gordana Supić, Mirjana Branković-Magić and Nebojša Jovic (November 28th 2012). DNA Methylation in the Pathogenesis of Head and Neck Cancer, Methylation - From DNA, RNA and Histones to Diseases and Treatment, Anica Dricu, IntechOpen, DOI: 10.5772/51169.