



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI

HOSPITAL DE PEDIATRIA

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
ONCOLOGÍA PEDIÁTRICA

ASOCIACIÓN DE LA SOBRE EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA GLUCOPROTEINA P  
CON LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO Y SOBREVIDA EN NIÑOS CON OSTEOSARCOMA

TESISTA

DRA. MARIANA ORTIZ AZPILCUETA  
MEDICO RESIDENTE DE ONCOLOGÍA PEDIÁTRICA  
[mariana\\_ortizazpilcueta@hotmail.com](mailto:mariana_ortizazpilcueta@hotmail.com)

TUTOR

DR. JAVIER ENRIQUE LÓPEZ AGUILAR  
MÉDICO JEFE DEL SERVICIO DE ONCOLOGÍA PEDIÁTRICA  
[onco\\_lab@yahoo.com](mailto:onco_lab@yahoo.com)

COTUTORA

DRA. ANA CAROLINA SEPULVEDA VILDÓSOLA  
DIRECTORA DE INVESTIGACIÓN Y EDUCACIÓN  
[anacsepulveda@hotmail.com](mailto:anacsepulveda@hotmail.com)

COLABORADOR

DRA. ALICIA GEORGINA SIORDIA REYES  
MÉDICO PATÓLOGO ADSCRITO AL HOSPITAL DE PEDIATRIA CMN S.XXI

MÉXICO, DISTRITO FEDERAL A 5 DE JULIO DE 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

TÍTULO DE LA TESIS: ASOCIACIÓN DE LA SOBRE EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE L  
GLUCOPROTEINA P CON LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO Y SOBREVIDA EN NIÑOS CON  
OSTEOSARCOMA



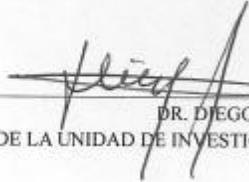
---

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



---

DRA. GRACIELA CASTAÑEDA MUCIÑO  
JEFE DE LA DIVISIÓN DE EDUCACIÓN  
SECRETARIO



---

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



---

DRA. ANA PAULINA RIOSCOVIAN SOTO  
MÉDICO ADJUNTO DEL SERVICIO DE ONCOLOGÍA PEDIÁTRICA  
VOCAL



---

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



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**

DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS  
Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud  
Coordinación de Investigación en Salud

**Dictamen de Autorizado**

Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud 3603  
HOSPITAL DE PEDIATRÍA, CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI, D.F. SUR

FECHA 11/04/2013

**DR. JAVIER ENRIQUE LÓPEZ AGUILAR**

**PRESENTE**

Tengo el agrado de notificarle, que el protocolo de investigación con título:

**ASOCIACION DE LA SOBRE EXPRESION INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA GLUCOPROTEINA P CON LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO Y SOBREVIDA EN NIÑOS CON OSTEOSARCOMA**

que usted sometió a consideración de este Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud, de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores, cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de ética y de investigación, por lo que el dictamen es **A U T O R I Z A D O**, con el número de registro institucional:

Núm. de Registro
R-2013-3603-18

ATENTAMENTE

**DR. HERMILO DE LA CRUZ YÁÑEZ**

Presidente del Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud No. 3603

HOSPITAL DE PEDIATRÍA  
C. M. N.

**RECIBIDO**  
22 ABR 2013

**IMSS**  
SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

I. M. S. S.  
ONCOLOGÍA PEDIÁTRICA

✓

## ÍNDICE

	PÁGINA
• RESUMEN ESTRUCTURADO	3
• ANTECEDENTES	4
• JUSTIFICACIÓN	11
• PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
• HIPÓTESIS	13
• OBJETIVO	14
• MATERIALES Y MÉTODOS	15
• DEFINICIÓN DE VARIABLES	16
• DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO	18
• ANALISIS ESTADÍSTICO	22
• RESULTADOS	23
• DISCUSIÓN	26
• CONCLUSIONES	30
• BIBLIOGRAFÍA	31
• ANEXOS	33

## RESUMEN ESTRUCTURADO

### ASOCIACIÓN DE LA SOBRE EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA GLUCOPROTEÍNA P CON LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO Y SOBREVIDA EN NIÑOS CON OSTEOSARCOMA

<sup>1</sup>Ortiz Azpilcueta Mariana, <sup>2</sup>López Aguilar Enrique, <sup>3</sup>Sepulveda Vildósola Ana Carolina, <sup>4</sup> Siordia Reyes Alicia Georgina.

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

Hospital de Pediatría CMN s.XXI, México, Distrito Federal.

**Introducción:** El resultado para los pacientes con osteosarcoma tratados con cirugía y/o radioterapia era pobre con una supervivencia a 2 años de 15% a 20%, a pesar de un adecuado control local del tumor primario. La eficacia de la quimioterapia para el tratamiento de osteosarcoma potencialmente puede ser obstaculizado por la presencia de resistencia a los medicamentos en la cual está implicado el aumento de expresión de una proteína llamada "P-glicoproteína" (Pgp), el cual también se asocia con una menor supervivencia.

**Diseño:** Cohorte, retrospectivo.

**Objetivos:** Se determinó si la sobreexpresión de la glucoproteína p está relacionada con la respuesta al tratamiento y menor supervivencia en los pacientes pediátricos con osteosarcoma.

**Material y métodos:** El procedimiento inmunohistoquímico para la determinación de la molécula de glucoproteína P consiste en la administración de un anticuerpo PGP 9.5, para cada muestra se realizó un control isotipo negativo, control positivo de calidad de tinción y control de expresión antigénica del material, en base a la intensidad de tinción. La expresión de glicoproteína P se aceptó como positiva cuando fue evidente una tinción de coloración rojiza en citoplasma positiva. Se llevó a cabo un estudio estadístico de la supervivencia mediante los pruebas de Kaplan Meier y Log Rank.

**Resultados:** Se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de metástasis al diagnóstico y la supervivencia con una  $p=0.028$  con una supervivencia para estos pacientes de 11.1% y un riesgo de fallecer si presentan metástasis al diagnóstico de 10 veces más, se encontró un riesgo incrementado de fallecer de 11.1 veces más con una  $p= 0.000$  en los pacientes que presentan una respuesta histológica de Rosen grado I y II y aunque no se encontró una asociación significativa estadísticamente con la supervivencia, si la hay clínica ya que los pacientes en este grado presentan una supervivencia de 38.9% con respecto a los pacientes en un grado III que tienen una supervivencia de 87.5% a 10 años. No se encontró una asociación estadística significativa entre la expresión de Pgp ni la supervivencia  $p=0.221$ , tampoco con la respuesta de Rosen, ni con la presencia de metástasis al diagnóstico.

**Discusión:** No se encontró una asociación estadísticamente significativa de la expresión de Pgp con la supervivencia, sin embargo consideramos que tienen una correlación clínica importante ya que de los pacientes que fallecieron en este estudio 58.5% expresaban Pgp, lo cual consideramos se deba al tamaño de la muestra, así mismo no se logró establecer significancia estadística con la respuesta a tratamiento pero consideramos que también pueda ser resultado del tamaño de muestra y que en un futuro debemos realizar estudios futuros para su determinación.

Es evidente que la supervivencia en los pacientes con OS disminuye de forma importante cuando se presenta enfermedad metastásica y que la Respuesta de Rosen es un factor pronóstico independiente para estos pacientes, sin embargo no restamos importancia a la expresión de Pgp como un factor primordial en la resistencia a drogas aunque sabemos que hay otros mecanismos asociados a la misma.

## ANTECEDENTES

El osteosarcoma es el tumor maligno primario de hueso derivado de las células mesenquimales primitivas, caracterizado por la presencia de estroma celular fusiforme productor de osteoide <sup>(1,2)</sup>. Ocupa el sexto lugar en frecuencia, correspondiendo a 2-4 % de las neoplasias en edad pediátrica. Se reporta que ocurre en Estados Unidos aproximadamente a 4.4 casos por millón en niños y adolescentes menores de 24 años; hay aproximadamente 400 nuevos casos de osteosarcoma cada año en los Estados Unidos en individuos menores de 20 años, con rangos similares internacionalmente <sup>(1)</sup>. En México ocupa octavo lugar en frecuencia con una incidencia de 2 a 3.5 casos por millón por año, y con una mortalidad de 2.57 por millón de defunciones, de acuerdo al último registro del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) <sup>(3)</sup>. El osteosarcoma es el más común de los tumores malignos de hueso <sup>(1,4)</sup>, siendo 35% de los sarcomas primarios de hueso y 56% de los tumores malignos de hueso en las primeras dos décadas de la vida <sup>(1)</sup>.

Tienen un comportamiento altamente agresivo y afectan principalmente a niños y adultos jóvenes <sup>(1,3,5)</sup>.

En la actual clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el osteosarcoma de hueso se divide en convencional, telangiectásico, de células pequeñas, central de bajo grado, secundario, parosteal, periosteal y variantes superficiales de alto, siendo un factor pronóstico importante la histología <sup>(1)</sup>.

Los factores de mal pronóstico son: histología telangiectásico, la localización en el esqueleto axial, tumores mayores de 15 cm, los que envuelven el periostio y dos o más estructuras adyacentes, pacientes menores de 10 años y mayores de 20 años <sup>(1,6,7)</sup>, DHL elevada al diagnóstico, niveles elevados de fosfatasa alcalina están asociados con un mayor riesgo de metástasis subsecuentes <sup>(1)</sup>. En 1976 se dio a conocer por Rosen el grado de necrosis en el espécimen quirúrgico, como un factor de respuesta a la quimioterapia neoadyuvante de gran importancia; esta respuesta clasifica a la necrosis en cuatro grados: Grado I (menor del 50%), grado II (51%-89%), grado III (90%-99%), grado IV (100%), considerándose como buena respuesta a tratamiento el grado III y IV; hasta la fecha la respuesta histológica de Rosen se considera el factor pronóstico independiente más importante en los pacientes con osteosarcoma <sup>(1,2,3,5,6)</sup>.

En la actualidad se ha dado importancia como factor pronóstico a los marcadores moleculares. Alteraciones en distintos componentes del sistema de control del ciclo celular, en particular las vías de supresión de tumores de los genes P53 y RB1; pérdida de heterocigosidad en el locus del gen RB tienen un pronóstico significativamente peor que los que no la presentan. La sobreexpresión de HER 2 está asociada con un resultado inferior. Se ha observado pérdida alélica a nivel de otros cromosomas como 3q, 13q y 18q en hasta

75%, lo cual sugiere la presencia de por lo menos dos genes supresores de tumores involucrados en la patogénesis y progresión del osteosarcoma <sup>(1,2)</sup>.

El factor pronóstico más importante es la extensión de la enfermedad al momento del diagnóstico, los pacientes con enfermedad metastásica tienen un pronóstico desfavorable. Aproximadamente el 15-20% tienen metástasis visibles radiológicamente al diagnóstico <sup>(1,3)</sup>.

El pronóstico de los pacientes con osteosarcoma aun permanece incierto a pesar de los avances en cirugía y tratamiento con quimioterapia <sup>(3,6)</sup>. El resultado para los pacientes con osteosarcoma tratados con cirugía y/o radioterapia era pobre con una supervivencia a 2 años de 15% a 20%, a pesar de un adecuado control local del tumor primario. Después de las medidas de control locales, 80% a 90% de los pacientes desarrollaron enfermedad metastásica de pulmón lo que sugiere que la mayoría de los pacientes con enfermedad aparentemente localizada tienen metástasis microscópicas pulmonares. Estos hallazgos llevaron a la investigación de la quimioterapia sistémica para prevenir la diseminación metastásica después de la resección quirúrgica <sup>(1,2,3,4)</sup>. Los primeros ensayos identificaron a cisplatino (DDP), doxorubicina (DOX) y altas dosis de methotrexate (MTX-HD) como los agentes más activos. La ifosfamida (I) con o sin etopósido (E) han mostrado resultados alentadores. El uso de la poliquimioterapia y resección quirúrgica ha mejorado drásticamente el pronóstico de los pacientes de osteosarcoma <sup>(1,2,8,9)</sup>, y con la terapia moderna de los osteosarcomas localizados resecables se ha logrado a 3 años una supervivencia libre de enfermedad del 60% al 70% <sup>(1,2,3)</sup>. Sin embargo para aquellos pacientes con enfermedad recurrente la supervivencia reportada sigue siendo mucho peor, a dos años de 10% a 30% <sup>(1)</sup>.

La eficacia de la quimioterapia para el tratamiento de osteosarcoma potencialmente puede ser obstaculizada por la presencia de resistencia a los medicamentos <sup>(1,4,6)</sup>. Probablemente, la resistencia a la quimioterapia, constituya el principal problema en el tratamiento del cáncer en general <sup>(2,3,4,8,9,10)</sup>. Por otra parte, en comparación con las lesiones primarias, una mayor parte de las metástasis de osteosarcoma fueron resistentes a múltiples fármacos <sup>(9)</sup>. La resistencia a drogas representa un factor pronóstico importante en el osteosarcoma <sup>(9)</sup>. Los mecanismos de resistencia a los medicamentos en osteosarcoma incluyen alteraciones en una variedad de proteínas relacionadas con el transporte de las drogas, descarga y metabolismo del fármaco <sup>(1)</sup>.

La mayoría de los tumores sólidos, de forma innata o adquirida, terminan siendo resistentes a múltiples agentes quimioterapéuticos, con estructura química y mecanismos de acción muy diferentes. Este fenómeno fue descrito experimentalmente y conocido como resistencia a múltiples drogas o MDR (“Multidrug Resistance”), que fue atribuido en un principio a una proteína transportadora de la membrana celular llamada p-glicoproteína (p de permeabilidad) <sup>(1,3,4,5, 6,9,10,11)</sup>. La resistencia relacionada con p-glicoproteína (Pgp) es el mecanismo de resistencia a múltiples drogas más extensamente estudiado <sup>(1,2,4,10,12,14)</sup>. Por

ello se la conoce también como MDR clásica o típica. Al gen que codifica a Pgp se le llama MDR1, y se localiza en el brazo largo del cromosoma 7<sup>(1,9,10,12)</sup>.

La historia de las proteínas causantes de resistencia a múltiples drogas o proteínas MDR, se inicia en 1973, con el descubrimiento por Keld Dano, de la expulsión activa de daunorrubicina en células tumorales resistentes. Estudios posteriores describieron el fenotipo celular resistente a múltiples drogas o fenotipo MDR, que consistía en que células seleccionadas para resistencia mediante la exposición a un único agente antineoplásico, desarrollaban resistencia a una amplia variedad de compuestos estructuralmente diferentes<sup>(4)</sup>. En 1976, Juliano y Ling descubrieron una glucoproteína en la membrana plasmática de células multirresistentes, que por sus características, parecía una buena candidata para ser una bomba de expulsión. Pero fue en 1983, cuando Victor Ling y otros investigadores, dieron a conocer que el aumento de expresión de esa proteína llamada “P-glicoproteína” (Pgp) estaba implicada en la resistencia a múltiples drogas en líneas celulares de mamíferos<sup>(11)</sup>.

La Pgp es una glucoproteína de membrana con un peso molecular de 170 kDa<sup>(5,10,14)</sup>; por este motivo se la llama también proteína P-170<sup>(10,12,14)</sup>, compuesta por una cadena de aproximadamente 1 280 residuos de aminoácidos que consiste en dos mitades homólogas (dímero), unidas entre sí. Cada mitad de la molécula presenta seis dominios hidrofóbicos transmembranales unidos, dispuestos en tres pares y asociados con un dominio hidrofílico C-terminal. La secuencia de aminoácidos contiene un extenso segmento hidrofóbico en el extremo N-terminal. Los segmentos transmembranales en la membrana plasmática están orientados de forma que el extremo C-terminal se sitúe en el lado citoplasmático de la membrana<sup>(12,14)</sup>. Los tres pares de segmentos transmembranales están separados por largas cadenas de aminoácidos en la cara citoplasmática de la membrana y cortas cadenas en la superficie celular. Además, la molécula presenta una cadena externa de carbohidratos, situada sobre la cadena exterior de aminoácidos que une los dos primeros segmentos transmembranales, cerca del extremo N-terminal de la molécula. Al menos 20 kDa de los 170-180 kDa de la proteína son debidos a los carbohidratos. Existen fuertes evidencias para asegurar que la porción exterior de carbohidratos no interviene en el transporte de drogas o reconocimiento. El estudio de las secuencias de Pgp muestra una estructura altamente conservada en la porción transmembranales N-terminal, la cual contiene las características de un dominio en forma de canal. Los dominios intracitoplasmáticos de unión e hidrólisis del ATP forman un poro y actúan conjuntamente en el transporte activo de drogas al exterior celular. Esta proteína actúa como una bomba extrusora dependiente de energía<sup>(9,14)</sup>. El eflujo se realiza a través del poro directa o indirectamente, tras la unión a moléculas transportadoras que pueden ser un péptido<sup>(14)</sup>.

Actúa como una bomba de expulsión ATP-dependiente, reduciendo la acumulación intracelular de varias sustancias, disminuyendo su acumulación en el citoplasma y de esta forma también la cantidad efectiva que reacciona con las dianas celulares<sup>(4,5,6, 9,10, 12,13,14)</sup>. Se especula que las drogas pasan a través de un poro hidrofóbico formado por un dominio transmembrana y que la salida de sustancias requiere de un cambio conformacional de la proteína dependiente de energía. Se ha sugerido que el estado de fosforilación de la Pgp pudiera regular este proceso y modular la resistencia a citotóxicos. Una segunda hipótesis

de cómo la Pgp logra disminuir la concentración intracelular de las drogas, postula que lo hace de forma indirecta, por regulación de gradientes de pH y/o eléctrico en las membranas plasmáticas<sup>(12)</sup>.

Se expresa normalmente en canaliculos biliares, colon, intestino delgado, suprarrenales, túbulos proximales del riñón, hígado, se han detectado altos niveles de Pgp en el endotelio capilar de cerebro y testículo y también en la barrera placentaria, en músculo, piel, pulmón y páncreas<sup>(5,9)</sup>. Se piensa que su función pueda ser la de aumentar la excreción y limitar la absorción de elementos nocivos para el organismo<sup>(4,5,10,12,14)</sup>.

Se ha detectado Pgp en varias neoplasias hematológicas y sólidas<sup>(4,5, 13)</sup>, pudiendo aparecer de “novo”, o ser inducida por el tratamiento con quimioterapia, hormonoterapia o radioterapia<sup>(5,13)</sup>. La sobreexpresión de Pgp en diferentes cánceres se ha relacionado con malas respuestas a la quimioterapia e intervalos libres de enfermedad reducidos<sup>(4,13)</sup>. Existe una expresión variable de la Pgp en hueso y cartílago, así como en líneas celulares de osteosarcoma. Al igual que en otros tumores, la expresión en las células del sarcoma osteogénico se incrementa cuando se exponen a agentes quimioterápicos<sup>(7,13,14,15)</sup>.

La expresión de Pgp determina un fenotipo celular resistente a varios productos naturales como son: antraciclinas (doxorubicina, daunorrubicina, idarrubicina), alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina), epipodofilotoxinas (etopósido, tenipósido) y taxanos (paclitaxel, taxotere), entre otros; y a compuestos exógenos como son los bloqueadores de los canales del calcio (verapamilo), digoxina, opiáceos, hidrocarburos aromáticos, complejos sintéticos como el Tc99-sestamibi, rodamina 123 o antivíricos como son los inhibidores de proteasas<sup>(9,10,14)</sup>.

Las dos principales manifestaciones de la resistencia a drogas son: resistencia intrínseca, la cual está relacionada con el fallo de la quimioterapia inicial y resistencia adquirida en la que inicialmente el tumor responde a la quimioterapia pero más tarde se vuelve resistente al tratamiento inicial y además a la terapia con otras drogas diferentes<sup>(8,14)</sup>.

Los cambios genéticos responsables de la resistencia a la quimioterapia pueden ocurrir al nivel del ADN, del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y de la proteína sintetizada. Para evaluar su expresión existen varios métodos: cariotipo, Southern blot, Dot blot, renaturalización del ADN en gel de agarosa, northern blot, slot blot, análisis de protección del ARN, hibridación in situ, reverso transcripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa, western blot, inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales, citometría de flujo-anticuerpos monoclonales, estudios funcionales con sustratos fluorescentes o radiactivos<sup>(12)</sup>.

La detección de la Pgp por técnicas de inmunohistoquímica se realiza al nivel de una célula en particular, es una prueba semicuantitativa que utiliza como control modelos celulares con niveles conocidos de Pgp. La definición de «positividad» varía entre diferentes investigaciones, incluso en algunos artículos publicados no se menciona el límite aceptado. Con el objetivo de optimizar el estudio inmunohistoquímico, se han desarrollado una gran variedad de anticuerpos monoclonales (AcMo) que pueden distinguir determinantes internas (C219, C494, ISB-1) o epítopes externos de la proteína (Hyb-612,MRK16,

2565/F4, 4F3.16, UIC-2)<sup>(5)</sup>. La determinación inmunohistoquímica es el procedimiento más empleado en los trabajos publicados al respecto. Esta técnica presenta unas ventajas evidentes, como los son el costo y la accesibilidad para su realización, teniendo una alta sensibilidad. La detección de una pequeña subpoblación celular que exprese glicoproteína es clínicamente relevante a efectos de quimiorresistencia, independientemente de su valoración cuantitativa. Las técnicas inmunohistoquímicas, además, permiten diferenciar en una muestra dada la expresión del marcador por células tumorales de la que pudiera exhibir el tejido conectivo <sup>(13)</sup>.

Los estudios de inmunohistoquímica y/o estudios de cuantificación con RT-PCR han explorado la expresión de P-glicoproteína en el osteosarcoma, y demostró la sobreexpresión de la glicoproteína P en 23% a 45%, con disminución de la supervivencia en los pacientes con tumores Pgp positivos. Un meta-análisis también propone que la Pgp se asocia con un mayor riesgo de progresión de la enfermedad. La sobreexpresión de MDR1, el gen que codifica la Pgp, también se ha explorado en cuanto a su papel en la progresión de osteosarcoma y su relevancia pronóstica <sup>(1)</sup>.

Así la identificación de la expresión de Pgp, específicamente en osteosarcomas, antes del inicio del tratamiento, podría ser utilizado como un factor, capaz de predecir el riesgo de progresión de la enfermedad y desarrollo de resistencia al tratamiento<sup>(5)</sup>.

Desde el trabajo de Baldini y cols. en 1995 varios grupos de investigación han pretendido establecer la expresión de Pgp como un factor pronóstico en el osteosarcoma <sup>(2,13)</sup>.

Baldini encontró que los niveles elevados de Pgp eran pronóstico en los pacientes con osteosarcoma, se asociaban con una pobre supervivencia libre de enfermedad, en sus resultados encontraron que la inmunorreactividad para Pgp y la necrosis postquimioterapia (respuesta de Rosen) eran dos variables relacionadas con la evolución clínica del osteosarcoma<sup>(9)</sup>.

En la serie de Hernández Cortés, P y cols. es destacable la relación de la inmunoeexpresión de Pgp en el pronóstico de osteosarcoma <sup>(13)</sup>.

En la misma tendencia que lo publicado por Serra y cols. los sarcomas de alto grado (IIB) que expresan Pgp tienen una supervivencia más corta y una mayor incidencia y precocidad de las metástasis con significación estadística. Estos datos son superponibles también a los que Baldini y cols. publicados a finales del 1995 <sup>(2,13)</sup>.

Chan y cols. Encontraron asociación entre la positividad de Pgp y pobre pronóstico <sup>(2)</sup>.

Kumta y col. Observaron que la expresión de Pgp asociada a la resistencia a doxorubicina son un fuerte indicador de falla terapéutica <sup>(2)</sup>.

Ocho de los nueve pacientes que expresaban el gen mdr-1 en la serie de Imanishi y cols. Fueron resistentes a la quimioterapia <sup>(11,13)</sup>.

Serra y cols. Encuentran una relación estadísticamente significativa entre la expresión de Pgp y la multirresistencia a agentes quimioterápicos en el osteosarcoma. En su serie, los tumores que expresan que la expresan tenían un mayor índice de metástasis y un peor pronóstico <sup>(13, 16)</sup>.

En el meta-análisis realizado por Pakos y Ioannidis se demostró convincentemente que la positividad de Pgp se asoció con un peor pronóstico sobre el riesgo de progresión a 2 años, sugieren que Pgp está relacionado con factores como el potencial metastásico <sup>(6)</sup>.

Pakbaz y cols. Encontraron que la positividad de Pgp no fue significativamente asociada con ninguna característica histopatológica o clínica excepto con la actividad mitótica elevada. Se demostró que la positividad de Pgp estuvo significativamente asociada con eventos adversos que incluían la recaída en cualquier localización o la muerte ( $p=0.002$ ), con sensibilidad y especificidad de la expresión de Pgp de 68% y 91% respectivamente; no se demostró una relación significativa entre la respuesta histológica posterior a la quimioterapia neoadyuvante<sup>(2)</sup>.

Takeshitay cols. Describieron dos líneas celulares murinas de osteosarcoma resistentes a adriamicina MOS/ADR1 y MOS/ADR2, que demostraban el clásico fenotipo multirresistente a drogas con sobreexpresión de Pgp, aumento del flujo de salida de drogas y disminución de la acumulación intracelular de las mismas; y en donde actuaron otros mecanismos de resistencia a drogas<sup>(4)</sup>.

Por el contrario, para Posl y cols. Este carácter inmunohistoquímico no guarda relación con el fracaso de tratamientos quimioterápicos en el osteosarcoma osteogénico y no predice la respuesta a la quimioterapia<sup>(7,13,15)</sup>.

Vergier y cols.<sup>52</sup> también señalan la expresión variable de Pgp en sarcomas humanos, pero no lo considera el mecanismo principal de su resistencia a las drogas<sup>(13)</sup>.

La importancia clínica potencial de la expresión del gen MDR 1 y Pgp ha llevado a múltiples estrategias con el fin de evitar o revestir los efectos de resistencia a las drogas Fisher y Sikic<sup>(3,8)</sup> definen los siguientes elementos:

- Uso de antineoplásicos que no son sustratos de la Pgp en casos con sobreexpresión del gen MDR 1 comprobada o cuando es muy probable. Por ejemplo, los compuestos del platino (cisplatino, carboplatino), los antimetabolitos (methotrexato, 5-fluoracilo, arabinósido de citosina, los agentes alquilantes (ciclofosfamida, carmustina) y la bleomicina. La acción terapéutica de estas drogas pudiera limitarse por la aparición de otros mecanismos de resistencia a la quimioterapia.
- Desarrollo de análogos, estructuralmente modificados, de agentes relacionados con la resistencia simultánea a múltiples drogas provocadas por el gen *mdr 1*, que mantengan su acción citotóxica y no son sustratos de la Pgp. Por ejemplo, la morfolinoantraciclinas y la anamicina.
- Utilización de transportadores liposomales. Por ejemplo, la doxorubicina encapsulada en liposomas mantiene su actividad contra las células que expresan la Pgp *in vitro*. Este método se ha empleado para aminorar la cardiotoxicidad pero se necesitan más pruebas para demostrar la regresión del fenotipo resistente.
- Inhibición de la expresión del gen MDR 1. Se han utilizado oligonucleótidos antisentido en modelos celulares que pudieran ser usados en ensayos clínicos. Administración simultánea de inhibidores de la Pgp y agentes antineoplásicos. Por ejemplo, los bloqueadores de los canales de calcio (verapamilo, nifedipino, nicardipina), los antipalúdicos (quinidina, quinacrina), las fenotiazidas (trifluoperazinas, flufenazina), las hormonas (tamoxifén, progesterona), los antibióticos (cefoperazone, ceftriaxone), la ciclosporina A (CsA) y el dipiridamol<sup>(12,13)</sup>.

La diversidad de la estructura y mecanismos de acción de estos productos sugieren que deben existir diferentes vías mediante acción de la Pgp y brinda una base para la combinación racional de algunos agentes <sup>(12,13)</sup>.

El control de la resistencia es un enfoque novedoso en el tratamiento de las enfermedades malignas <sup>(12)</sup>.

La capacidad para predecir el curso de osteosarcoma, identificando los pacientes que no responden a la quimioterapia convencional ayudaría a guiar el tratamiento, lo que permite la inclusión de agentes capaces de modular la resistencia a múltiples fármacos <sup>(9)</sup>.

La sobreexpresión de la glicoproteína p, puede ayudar a establecer un factor principal en la multirresistencia, relacionándose con pobre respuesta a la quimioterapia, podría ser utilizado como un factor capaz de predecir el riesgo de progresión y sobrevida reducidos en los pacientes pediátricos con osteosarcoma.

## JUSTIFICACIÓN

Los pacientes con osteosarcoma tienen una baja sobrevida, sobre todo aquellos pacientes que desarrollan una enfermedad recurrente. En nuestro Hospital se reporta una sobrevida global para los pacientes con osteosarcoma de 26%.

La sobreexpresión de la glicoproteína p, puede ayudar a establecer un factor principal en la multirresistencia, relacionándose con pobre respuesta a la quimioterapia, podría ser utilizado como un factor capaz de predecir el riesgo de progresión y sobrevida reducidos en los pacientes pediátricos con osteosarcoma, para así diseñar nuevos esquemas de quimioterapia específicos según el tipo de paciente.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La sobrevida de niños con OS en nuestro Hospital es de 26%. Se ha reportado una relación importante de esta con la resistencia a fármacos causada por Pgp. Es importante establecer una relación entre estas para comprender mejor el comportamiento de estos tumores.

¿Cuál es la asociación entre la sobreexpresión inmunohistoquímica de la glicoproteína p con la respuesta al tratamiento y pobre sobrevida en los pacientes pediátricos con osteosarcoma?

## HIPÓTESIS

La sobreexpresión de glucoproteína p está relacionada con mala respuesta al tratamiento y menor supervivencia en los pacientes pediátricos con osteosarcoma en un 23% a 45%.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Determinar si la sobreexpresión de la glucoproteína p está relacionada con mala respuesta y menor sobrevida en los pacientes pediátricos con osteosarcoma.

Determinar la sobreexpresión de glicoproteína p con la respuesta al tratamiento de los pacientes pediátricos con osteosarcoma.

### OBJETIVOS SECUNDARIOS

Establecer:

Asociación entre la sobrevida y sexo de los pacientes pediátricos con osteosarcoma.

Asociación entre sobrevida e histología de los pacientes pediátricos con osteosarcoma.

Asociación entre sobrevida y localización de los pacientes pediátricos con osteosarcoma.

Asociación entre sobrevida y metástasis al diagnóstico de los pacientes con osteosarcoma.

Asociación entre sobrevida y respuesta histológica de Rosen en los pacientes pediátricos con osteosarcoma.

Asociación entre sobrevida y sobreexpresión de los pacientes pediátricos con osteosarcoma.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### DISEÑO DEL ESTUDIO

Cohorte, retrospectivo.

### POBLACIÓN DEL ESTUDIO

Pacientes pediátricos con osteosarcoma

Muestreo no aleatorio por conveniencia de todos los pacientes con diagnóstico de osteosarcoma en el periodo de estudio de 2002 a 2012 en el hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI.

### CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Todos los pacientes con Osteosarcoma menores de 17 años, diagnosticados en el Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI.
- De cualquier sexo
- Que tengan expediente completo
- Que cuenten con bloque de parafina para realización de inmunohistoquímica

### CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Pacientes que no recibieron tratamiento en este hospital.

### CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

Pacientes en los que el bloque de parafina no sea suficiente para la realización de técnica de inmunohistoquímica

## DEFINICIÓN DE VARIABLES.

### **Edad.**

Definición conceptual: Tiempo transcurrido desde el nacimiento hasta la actualidad.

Definición operacional: Edad reportada en el expediente al momento del diagnóstico.

Tipo de variable: Universal.

Unidades de medición: Meses.

Escala de medición: Cuantitativa continua.

### **Sexo.**

Definición conceptual: Se refiere al género de una persona.

Definición operacional: Género reportado en el expediente al momento del diagnóstico.

Tipo de variable: Universal.

Unidades de medición: Femenino o masculino.

Escala de medición: Cualitativa nominal.

### **Sobrevida global.**

Definición conceptual: Meses que permanece vivo el paciente desde que se realiza el diagnóstico.

Definición operacional: Meses que transcurren desde el diagnóstico hasta la última consulta o defunción.

Tipo de variable: Dependiente.

Unidades de medición: Meses.

Escala de medición: Cuantitativa continua.

### **Sobrevida libre de enfermedad.**

Definición conceptual: Meses que el paciente pasa libre de enfermedad desde el diagnóstico hasta la recaída.

Definición operacional: Meses que transcurren desde el diagnóstico hasta la recaída.

Tipo de variable: Dependiente.

Unidades de medición: Meses.

Escala de medición: Cuantitativa continua.

### **Expresión de glucoproteína p:**

Definición conceptual: Expresión membranar de la Glucoproteína p determinado por inmunohistoquímica.

Definición operacional: Expresión reportada por inmunohistoquímica de glucoproteína p.

Tipo de variable: Independiente.

Unidades de medición: Positivo/Negativo.

Escala de medición: Cualitativa nominal.

### **Respuesta de Rosen:**

Definición conceptual: Porcentaje de necrosis en la pieza quirúrgica al momento del tratamiento local (Grado I: 50%, Grado II: 51%-89%, Grado III: 90%-99%, Grado IV: 100%)

Definición operacional: Porcentaje de necrosis reportado en el reporte de patología después de realizar el tratamiento local.

Tipo de variable: Dependiente.

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

Escala de medición: Cualitativa ordinal.

### **Localización:**

Definición conceptual: Lugar donde se localiza la tumoración.

Definición operacional: Presencia del tumor en esqueleto axial o en extremidad al momento del diagnóstico.

Tipo de variable: Confusión.

Escala de medición: Cualitativa nominal.

Unidades de medición: Axial/periférico.

**Metástasis al diagnóstico:**

Definición conceptual: Presencia de un foco tumoral fuera de la localización primaria.

Definición operacional: Presencia de lesiones metastásicas al momento del diagnóstico reportadas en el expediente clínico.

Tipo de variable: Confusión.

Escala de medición: Cualitativa nominal.

Unidades de medición: Si/No.

## DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

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

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

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

Este estudio fue aprobado por el CIS con No. R-2013-360318.

Se revisaron los expedientes de todos los pacientes menores de 17 años con osteosarcoma diagnosticados en el Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI en el periodo de enero de 2002 a diciembre de 2012.

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

### DESPARAFINAR

Colocar en la parrilla a 60° por 30 minutos

Uso del tren:

Reposar en xileno 5 minutos para retirar exceso de parafina

Xileno (recipiente 2) 10 lavados y escurrir

Alcohol absoluto 10 lavados y escurrir

Alcohol al 70% 10 lavados y escurrir

Alcohol al 50% 10 lavados y escurrir

Agua bidestilada (agua inyectable) 1 minuto, mantener húmedo



Alcohol al 50%	10 lavados y escurrir
Alcohol al 70%	10 lavados y escurrir
Alcohol absoluto	10 lavados y escurrir
Xileno (recipiente 1)	10 lavados y escurrir
Xileno (recipiente 2)	10 lavados y escurrir

Montaje:

En cada laminilla se aplicará a la orilla una gota de Eco Mount para pegar el cubre objeto y dejar secar a la intemperie.

- La solución tendrá aspecto lechoso y se deberá sacar de la olla junto con el recipiente para esperar a que se temple con la temperatura ambiente en un aproximado a 20 minutos.

Ecurrir y sumergir en agua bidestilada 10 lavados y escurrir,  
 Pasar a TBS (termina la recuperación).

Posteriormente el patólogo observó las laminillas para determinar la positividad de Pgp la cual se observó en el citoplasma de las muestras y se infirió como positivo la coloración rojiza del citoplasma en una cruz y 10% de la muestra de tejido.

A la semana se realizó una nueva revisión de las laminillas para determinar si concordaba con la observación realizada una semana previa.

Posteriormente se realizó el análisis estadístico que se describe a continuación.

## ANALISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el programa SPSS versión 20.0.

Se realizó estadística descriptiva para el análisis de los datos con porcentajes para las variables cualitativas y medias para las variables cuantitativas.

Estadística inferencial:

- Asociación con  $\chi^2$  y OR.
- Supervivencia e intervalo libre de enfermedad mediante los pruebas de Kaplan Meier y diferencias entre grupos con Log Rank test.

## RESULTADOS

El presente estudio se realizó en el Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI en el periodo comprendido en enero 2002 a diciembre de 2012, en el cual se identificaron 32 pacientes con osteosarcoma de los cuales se incluyeron 26 pacientes ya que estos contaban con bloque de parafina, 16 (61.5%) masculinos y 10(38.5%) femeninos con una relación hombre mujer de 1.6:1. La edad media al diagnóstico fue de  $128.8 \pm 45.02$  meses con un rango de 42 a 192 meses (tabla 1).

En cuanto a la localización 11 (42.3%) fueron en fémur distal, 5(19.2%) de fémur proximal, 4(15.4%) de tibia proximal, 3 de húmero (11.5%), 1 (3.8%) en tibia distal, 1 (3.8%) en peroné izquierdo y 1(3.8%) en radio izquierdo (tabla 1).

Respecto a la extensión, 9 (34.6%) pacientes presentaron enfermedad metastásica pulmonar al momento del diagnóstico mientras que los 17(65.4%) restantes no las presentaron. Sin embargo 5 (29.4%) de los 17 pacientes sin metástasis al diagnóstico la desarrollaron durante los primeros 12 meses de tratamiento (tabla 1).

Las histologías más comunes encontradas fueron osteoblástico en 17 (65.4%) pacientes, condroblástico en 3 (11.5 %) pacientes y telangiectásico 6 (23.1 %) pacientes (tabla 1).

De los 26 pacientes estudiados, se preservaron un total de 11 pacientes (42.3%), de los cuales siete son de fémur, dos de tibia, uno de húmero y uno de radio. Los restantes 15 (57.7%)pacientes fueron sometidos a cirugía radical (tabla 1).

La respuesta histológica de Rosen fue la siguiente: grado I 7 (26.9%) pacientes, grado II 11 (42.3%) pacientes, grado III 8 (30.8%) pacientes, no hubo grado IV, de estos pacientes se consideraron como buena respuesta a tratamiento solo los que presentaron grado III (tabla 1).

En cuanto al estado actual de los pacientes 14 (53.8%) se encuentran vivos, 12 (46.2%) pacientes fallecieron de los cuales 10(38.4%) fallecieron por progresión tumoral y 2 (7.69%) por sepsis grave.

Se determinó Pgp en las muestras de tejido tumoral obtenidas al diagnóstico de todos los pacientes incluidos, encontrando que 14 (53.8%) no expresaron Pgp y los 12 (46.2%) restantes presentaron expresión positiva (tabla 1).

En cuanto a la mortalidad por grupos encontramos lo siguiente:

De los 12 pacientes fallecidos 8 (66.6%) fueron masculino, 4 (33.3%) femeninos sin encontrar una asociación estadísticamente significativa con una  $p= 0.619$  con intervalo de confianza(IC) de 0.701 a 0.464 (tabla 2).

En cuanto a la histología 6 (50%) de los pacientes fallecidos tenían histología osteoblástica, 4 (33.3%) telangiectásica y 2 (16.6%) condroblástica; no hubo asociación estadísticamente significativa entre la mortalidad y la histología con una  $p=0.312$  y un  $IC$  de 0.308 a 0.158 (tabla 2).

De acuerdo a la presencia de metástasis 8(66.6%) de los pacientes fallecieron con un PR de 10 con una  $p=0.001$  y un  $IC$  de 2.451 a 275.826 (tabla 2).

En cuanto a la respuesta a tratamiento de los pacientes que presentaron una mala respuesta a tratamiento grupo I y II de Rosen fallecieron 11 (91.6%) y con buena respuesta a tratamiento grupo III de Rosen 1 (8.3%) con PR de 11 con  $p=0.000$  y un  $IC$  de 1.103 a 109.674 (tabla 2).

En cuanto a la expresión de Pgp la mortalidad de los pacientes fallecidos 7 (58.3%) expresaron Pgp positiva y los restantes 5 (41.6%) no expresaron Pgp, no se encontró una asociación estadísticamente significativa con un  $p=0.249$  e  $IC$  0.81 a 1.936 (tabla2).

De acuerdo a la expresión de Pgp y la respuesta al tratamiento se encontró que aquellos pacientes con mala respuesta a tratamiento grupo I y II de Rosen los cuales fueron 18 (69.2%) del total de pacientes, 11 (61.1%) expresaron Pgp con  $p=0.22$  con  $IC$  de 0.009 a 0.906 (tabla 2).

En cuanto a la extensión de la enfermedad y la expresión de Pgp se realizó una asociación inferencial encontrando que 12 (46.1%) pacientes con Pgp positiva de los cuales 5 (41.6%) presentó metástasis al momento del diagnóstico sin encontrar significancia estadística con una  $p=0.484$  con  $IC$  0.110 a 2.862 (tabla 2).

Se encontró una sobrevida global de 53.8% a 10 años y un rango entre 45.067 a 90.88 (figura 1).

Y una sobrevida libre de enfermedad de 46.5 meses y un rango de 40.662 a 89.693 (figura 2).

Se realizó asociación entre las sobrevidas y el sexo de los pacientes encontrando una sobrevida estimada de 41% a 10 años en los pacientes masculinos y 50% a 10 años en los femeninos con una  $p=0.547$  sin encontrar asociación estadística significativa (figura 3).

En cuanto a la asociación entre la localización y sobrevida se observó la peor sobrevida en aquellos que se presentaron en tibia y radio con una estimación de 0 meses en cada uno (figura 4).

En cuanto a la histología presentaron los osteoblásticos presentaron una sobrevida de 64.7% a 10 años, los ondroblásticos de 33.3% a 10 años y los telangiectasicos de 33.3% a 10 años con una  $p=0.78$  (figura 5).

De acuerdo a la presencia de metástasis al diagnóstico la para los OS localizados fue de 76.5% a 10 años y de 11.1% a 10 años para los metastásicos con una  $p=0.028$  (figura 6).

De acuerdo a la respuesta a tratamiento la sobrevida para los grupo I y II que representan mala respuesta a tratamiento la sobrevida a 10 años de 38.9% y de los del grupo III con buena respuesta a tratamiento 87.5% a 10 años con un  $p=0.134$  (figura 7).

En cuanto a la expresión de Pgp encontramos que aquellos pacientes que no la expresaron tuvieron una sobrevida de 64.3% a 10 años y los pacientes que si la expresaron tuvieron una sobrevida de 53.8% a 10 años con una  $p=0.221$  (figura 8).

Los pacientes que presentaron mala respuesta a tratamiento con una respuesta histológica de Rosen grado III y Pgp negativo presentaron una sobrevida de 85.7% a 10 años, mientras que los pacientes que expresaron Pgp y tuvieron una respuesta histológica de Rosen grado I y II tuvieron una sobrevida de 36.4% a 10 años con una  $p=0.583$  (figura 9 a y b).

En cuanto a la regresión logística, encontramos significancia estadística para la presencia de metástasis con  $p=0.49$ , para el resto de los factores no se presento significancia estadística, estos son género con  $p=0.585$ , diagnóstico  $p=0.750$ , localización  $p=0.961$ , expresión de Pgp 0.893 y respuesta histológica de Rosen 0.558.

## DISCUSIÓN

Es evidente que la mortalidad en este tipo de neoplasias es elevada, y si bien la literatura internacional reporta una sobrevida esperada cercana al 70%, la encontrada en nuestra experiencia fue de un 53.8% a 10 años, con una sobrevida libre de enfermedad de 46.5% muy cercano a lo reportado en la literatura mundial.

En cuanto a la localización la más común se reporto en fémur distal en un 42.3% locual concuerda con la literatura en la cual se reporta ésta como la localizació más frecuente seguida de tibia proximal y húmero <sup>(1)</sup>.

No encontramos una asociación entre la histología de estos pacientes y la sobrevida, aunque mundialmente se acepta que la histología es un factor pronóstico imortante, siendo la variedad telangiectásica la de peorpronóstico <sup>(1)</sup>, consideramos que el que no se encontrará esta asocacion significativamente estadística, clínicamente si tiene relevancia ya que de los pacientes con histología telangiectásica que fueron 4 incluídos en nuestro estudio 3 fallecieron,este resultado probablemente no tuvo relevancia estadística debido a que el número depacientes con esta variedad era pequeño, pero consideramos que es un factor pronóstico importante.

En este estudio los pacientes que presentaron enfermedad metastásica al momento del diagnóstico fue de 34.6%, 5 (29.4%) pacienntes más la desarrollaron en forma temprana en los primeros 12 meses posteriores al diagnóstico, con un total de 53.8% lo cual es muy similar a lo reportado en la literatura mundial en donde se reportan 20% de metástasis al momento del diagnóstico y 46% de los pacientes las desarrollaran de forma temprana.

Debe considerarse que en la mayoría de los países desarrollados, lo que se reporta es una sobrevida que ha mejorado del 15% cuando sólo se trataba a estos pacientes con cirugía, al 70% con el advenimiento de la quimioterapia, pero esta sobrevida reportada es sólo en OS localizados. Sin embargo, también se ha considerado que un tercio de los pacientes presentará enfermedad metastásica pulmonar o recurrencia al sitio del primario, y que estos pacientes finalmente mueren como consecuencia de la enfermedad con una sobrevida mucho menor de 10-30% <sup>(1,2,3,4,6)</sup>, razón por la cual no es de extrañarse que la mayoría de las defunciones sean atribuidas a progresión tumoral, tal como se establece en la mayoría de las publicaciones <sup>(1,2,3,4,6)</sup>, lo cual concuerda con lo encontrado en el presente estudio ya que en los pacientes con enfermedad localizada tienen una sobrevida de 76.5% a 10 años, mientras que en los pacientes que presentan enfermedad metastástasica al momento del diagnóstico encontramos una disminucion muy importante de la sobrevida reportandose de 11.1% a 10 años.

Otro factor pronóstico independiente al cual se le ha dado mucha importancia es la respuesta histológica de Rosen la cual s emide por el grado de necrosis en la pieza tumoral se considera com mala respuesta grado I y II y como buena respuesta a tratamiento

neoadyuvante el grado III y IV <sup>(1,3)</sup>, nosotros encontramos un 26.9% en grado I, 42.3% en grado II y 30.8% en grado III, no se encontraron pacientes grado IV, en la asociación que se realizó con la supervivencia encontramos significancia estadística y clínica ya que de los 18 pacientes del grupo I y II, 11 (91.6%) pacientes fallecieron con un riesgo estimado de 11 y una  $p=0.000$ , sin embargo de los 8 pacientes del grupo III solamente 1 (8.3%) falleció. Esto concuerda con lo encontrado en los estudios realizados desde 1976 por Rosen en donde se establece la respuesta histológica como el factor pronóstico independiente más importante en la supervivencia <sup>(1,3)</sup>.

En 1973, el descubrimiento por Keld Dano, de la expulsión activa de daunorrubicina en células tumorales resistentes, dan inicio del estudio de la resistencia a múltiples drogas, con estudios posteriores describieron el fenotipo celular resistente a múltiples drogas o fenotipo MDR, que consistía en que células seleccionadas para resistencia mediante la exposición a un único agente antineoplásico, desarrollaban resistencia a una amplia variedad de compuestos estructuralmente diferentes <sup>(4)</sup>. En 1976, Juliano y Ling descubrieron una glucoproteína en la membrana plasmática de células multirresistentes, que por sus características, parecía una buena candidata para ser una bomba de expulsión. Pero fue en 1983, cuando Victor Ling y otros investigadores, dieron a conocer que el aumento de expresión de esa proteína llamada “P-glicoproteína” (Pgp) estaba implicada en la resistencia a múltiples drogas en líneas celulares de mamíferos <sup>(11)</sup>.

La Pgp es una glucoproteína de membrana con un peso molecular de 170 kDa <sup>(5,10,14)</sup>; por este motivo se la llama también proteína P-170 <sup>(10,12,14)</sup>, compuesta por una cadena de aproximadamente 1 280 residuos de aminoácidos que consiste en dos mitades homólogas (dímero), unidas entre sí. Cada mitad de la molécula presenta seis dominios hidrofóbicos transmembranales unidos, dispuestos en tres pares y asociados con un dominio hidrofílico C-terminal. La secuencia de aminoácidos contiene un extenso segmento hidrofóbico en el extremo N-terminal. Los segmentos transmembranales en la membrana plasmática están orientados de forma que el extremo C-terminal se sitúe en el lado citoplasmático de la membrana <sup>(12,14)</sup>. El estudio de las secuencias de Pgp muestra una estructura altamente conservada en la porción transmembranal N-terminal, la cual contiene las características de un dominio en forma de canal. Los dominios intracitoplasmáticos de unión e hidrólisis del ATP forman un poro y actúan conjuntamente en el transporte activo de drogas al exterior celular. Esta proteína actúa como una bomba extrusora dependiente de energía <sup>(9,14)</sup>. El flujo se realiza a través del poro directa o indirectamente, tras la unión a moléculas transportadoras <sup>(14)</sup>.

La sobreexpresión de Pgp en diferentes cánceres se ha relacionado con malas respuestas a la quimioterapia e intervalos libres de enfermedad reducidos <sup>(4,13)</sup>, en nuestro estudio encontramos que 12(46.2%) pacientes expresaron Pgp sin embargo no encontramos una relación significativamente estadística con la respuesta a tratamiento valorada por la respuesta histológica de Rosen con una  $p=0.22$ , sin embargo clínicamente tiene importancia ya que de los 18 pacientes en grupo I y II de Rosen en nuestro estudio 11 (61.1%) de los

pacientes expresaron Pgp, esto probablemente se deba al tamaño de la muestra y consideramos que se deben realizar estudios posteriores en donde se incluyan un mayor número de pacientes.

La expresión de Pgp determina un fenotipo celular resistente a varios productos naturales como son: antraciclinas (doxorubicina, daunorrubicina, idarrubicina), alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina), epipodofilotoxinas (etopósido, tenipósido) y taxanos (paclitaxel, taxotere), entre otros; y a compuestos exógenos como son los bloqueadores de los canales del calcio (verapamilo), digoxina, opiáceos, hidrocarburos aromáticos, complejos sintéticos como el Tc99-sestamibi, rodamina 123 o antivíricos como son los inhibidores de proteasas<sup>(9,10,14)</sup>.

Lo anterior dio pie al desarrollo del estudio nacional intergrupo del *Children's Cancer Group* (CCG) y del *Pediatric Oncology Group* (POG) en 1992, para el tratamiento y estudio del niño con OS y la posible participación de esta glicoproteína como factor pronóstico independiente, y aunque los resultados no aportaron la evidencia suficiente para apoyar la modificación de los regímenes de tratamiento para los pacientes en quienes se expresaba esta P-gp, y tampoco se encontró ser un factor pronóstico independiente en la sobrevida de este grupo de pacientes, si es de considerarse intensificar más los tratamientos en el grupo de pacientes que si la expresan, más que cambiar un esquema terapéutico dado que la antraciclina se ha mantenido como una droga de primera línea en el manejo de estos tumores<sup>(3)</sup>. En el presente estudio tampoco encontramos que la Pgp sea un factor pronóstico independiente para la sobrevida de los pacientes con osteosarcoma, sin embargo en la asociación que se realizó entre la expresión de Pgp y la respuesta histológica de Rosen aunque no se encontró una asociación estadísticamente significativa, si tienen una correlación clínica importante ya que de los 18 pacientes que presentaron una respuesta grado I y II que se traduce como una mala respuesta al tratamiento neoadyuvante 11 que representa 61.1% expresaron Pgp en la muestra basal de tejido neoplásico con lo cual inferimos que es un factor importante para la resistencia a fármacos aunque no tenga un impacto en la sobrevida de los pacientes y que sería importante considerar otras opciones terapéuticas para los pacientes que la expresen al momento del diagnóstico para minimizar al mínimo la resistencia a drogas.

Desde el trabajo de Baldini y cols. en 1995 varios grupos de investigación han pretendido establecer la expresión de Pgp como un factor pronóstico en el osteosarcoma<sup>(2,13)</sup>.

Baldini encontró que los niveles elevados de Pgp eran pronóstico en los pacientes con osteosarcoma, se asociaban con una pobre sobrevida libre de enfermedad, en sus resultados encontraron que la inmunorreactividad para Pgp y la necrosis postquimioterapia eran dos variables relacionadas con la evolución clínica del osteosarcoma<sup>(9)</sup>. En este estudio no se encontró una asociación importante entre la sobrevida libre de enfermedad y Pgp, pero en cuanto a la correlación clínica de Pgp con la respuesta histológica de Rosen si se encontró importancia clínica ya que de los 18 pacientes de grupo I y II de Rosen 11 (61.1%) presentaron Pgp positiva aunque estadísticamente no resultara significativo.

En la serie de Hernández Cortés, P y cols. es destacable la relación de la inmunoexpresión de Pgp en el pronóstico de osteosarcoma <sup>(13)</sup>, en este estudio no consideramos que Pgp sea un factor pronóstico para los pacientes con osteosarcoma, ya que asociación entre Pgp y sobrevida no resultó estadísticamente significativa, pero esto probablemente sea debido al tamaño de muestra ya que en cuanto a la clínica se encontró que de los 12 pacientes fallecidos 7 (58.3%) fallecieron.

Chan y cols. Encontraron asociación entre la positividad de Pgp y pobre pronóstico <sup>(2)</sup>, en nuestro estudio no se pudo determinar una asociación estadísticamente significativa en cuanto a la sobrevida para establecer a la expresión de Pgp como un factor pronóstico pero como ya se explicó probablemente sea al tamaño de muestra y consideramos que se deben realizar estudios subsiguientes en donde el tamaño de muestra sea mayor.

Kumta y col. Observaron que la expresión de Pgp asociada a la resistencia a doxorubicina son un fuerte indicador de falla terapéutica <sup>(2)</sup>, nosotros encontramos una correlación clínica importante con la respuesta a tratamiento como ya se explicó, en este estudio a todos los pacientes se administró quimioterapia neoadyuvante con antracíclico lo cual correlaciona con los descrito por Kumta.

Ocho de los nueve pacientes que expresaban el gen mdr-1 en la serie de Imanishi y cols. Fueron resistentes a la quimioterapia <sup>(11,13)</sup>. En nuestro estudio se reportó que 11(61.1%) pacientes expresaron Pgp de los 18 pacientes que presentaron Respuesta de Rosen I y II lo cual se traduce como resistencia a drogas presente en estos pacientes.

Serra y cols. Encuentran una relación estadísticamente significativa entre la expresión de Pgp y la multiresistencia a agentes quimioterápicos en el osteosarcoma, lo cual no se pudo establecer en nuestro estudio quizá por el tamaño de la muestra pero la relación clínica entre la expresión de Pgp y respuesta a tratamiento fue importante. En su serie, los tumores que expresan que la expresan tenían un mayor índice de metástasis y un peor pronóstico <sup>(13, 16)</sup>, en el nuestro la relación entre la sobrevida y la presencia de metástasis al momento del diagnóstico fue estadísticamente significativa y concordamos con lo establecido mundialmente en que la presencia de metástasis sigue siendo el factor pronóstico más importante.

En el meta-análisis realizado por Pakos y Ioannidis se demostró convincentemente que la positividad de Pgp se asoció con un peor pronóstico sobre el riesgo de progresión a 2 años, sugieren que Pgp está relacionado con factores como el potencial metastásico <sup>(6)</sup>, en el estudio realizado en nuestro centro no logramos establecer una relación entre la presencia de metástasis y la expresión de Pgp con una  $p=0.484$  por lo cual creemos que Pgp no está relacionada con potencial metastásico, más bien de acuerdo a los estudios realizados desde 1995 se ha establecido como una glucoproteína que determina la resistencia a drogas en los pacientes con diferentes neoplasias y se tienen bien establecido que la resistencia drogas de las metástasis es aún mayor <sup>(1)</sup>.

Pakbaz y cols. Encontraron que la positividad de Pgp no fue significativamente asociada con ninguna característica histopatológica o clínica excepto con la actividad mitótica elevada. Se demostró que la positividad de Pgp estuvo significativamente asociada con eventos adversos que incluían la recaída en cualquier localización o la muerte ( $p=0.002$ ),

con sensibilidad y especificidad de la expresión de Pgp de 68% y 91% respectivamente; no se demostró una relación significativa entre la respuesta histológica posterior a la quimioterapia neoadyuvante<sup>(2)</sup>. En el presente estudio no se logro establecer una relación significativamente estadística con la sobrevida, ni con la presencia de metástasis, solamente establecimos una relación clínica con la respuesta a l tratamiento neoadyuvante, lo cual concuerda con los estudios que se han realizado hasta el momento y en donde se ha establecido que Pgp es una importante glucoproteína de membrana que determina resistencia a fármacos<sup>(1,2,3,6,9,12)</sup>.

Takeshitay cols. Describieron dos líneas celulares murinas de osteosarcoma resistentes a adriamicina MOS/ADR1 y MOS/ADR2, que demostraban el clásico fenotipo multirresistente a drogas con sobreexpresión de Pgp, aumento del flujo de salida de drogas y disminución de la acumulación intracelular de las mismas; y en donde actuaron otros mecanismos de resistencia a drogas<sup>(4)</sup>, está bien establecido que los mecanismos de resistencia a drogas son diversos y que actúan varios incluso en un solo paciente, consideramos que la expresión de Pgp es un importante factor para la misma pero no el único mecanismo ya que la hipoxia, la falta de vascularización la cual evita que los nutrientes lleguen a la parte necrótica de los tumores y otros como la formación de vesículas para la expulsión de fármacos son mecanismos importantes y que pueden actuar en un mismo paciente<sup>(1)</sup>.

Por el contrario, para Posl y cols. Este carácter inmunohistoquímico no guarda relación con el fracaso de tratamientos quimioterápicos en el osteosarcoma osteogénico y no predice la respuesta a la quimioterapia<sup>(7,13,15)</sup>, en este estudio consideramos que la expresión de Pgp tienen importancia clínica ya que los pacientes que presentaban resistencia a drogas determinada por la mala respuesta a tratamiento presentaban la expresión positiva de esta glucoproteína en un 61.1% sin embargo no logramos encontrar una significancia estadística probablemente por el tamaño de la muestra.

Vergier y cols. también señalan la expresión variable de Pgp en sarcomas humanos, pero no lo considera el mecanismo principal de su resistencia a las drogas<sup>(13)</sup>, como ya lo mencionamos anteriormente Pgp tiene un importante papel en el mecanismo de resistencia drogas pero tampoco consideramos que sea el único mecanismo por el cual las neoplasias desarrollan resistencia.

En este estudio se estableció que las metástasis siguen siendo el factor pronóstico más imortante para los pacientes con osteosarcoma viendo una asociación importante con la sobrevida, ya que de los pacientes que desarrollaron metástasis se establecio un riesgo de fallecer de 66.6% , al igual que la Respuesta histológica de Rosen como factor pronóstico independiente para estos pacientes ya que también encontramos una importante asociación con la sobrevida con  $p= 0.000$  en donde el 91.6% que presentaron una respuesta de rosen grado I y II fallecieron con un incremento en el riesgo de 11.1 veces más.

No se encontró una asociación estadísticamente significativa de la expresión de Pgp con la sobrevida, sin embargo consideramos que tienen una correlación clínica importante ya que de los pacientes que fallecieron en este estudio 58.5% expresaban Pgp, lo cual consideramos se deba al tamaño de la muestra, así mismo no se logró establecer

significancia estadística con la espuesta a tratamiento pero consideramos que también pueda ser resultado del tamaño de muestra y que en un futuro debamos realizar estudios futuros para su determinación.

Es evidente que la sobrevida en los pacientes con OS dismiuye de forma importante cuando se presenta enfermedad metastásica y que la Respuesta de Rosen es un factor pronóstico independiente para estos pacientes, sin embargo no restamos importancia a la expresión de Pgp como una factor primordial en la resistencia a drogas aunque sabemos que hay otros mecanismo asociados a la misma.

## CONCLUSIONES

Se encontró una sobrevida global de 53.8% a 10 años y un rango entre 45.067 a 90.88 (figura 1).

Y un intervalo libre de enfermedad de 46.5 meses y un rango de 40.662 a 89.693 (figura 2).

En cuanto a la expresión de Pgp encontramos que aquellos pacientes que no la expresaron tuvieron una sobrevida de 64.3% a 10 años y los pacientes que si la expresaron tuvieron una sobrevida de 53.8% a 10 años con una  $p=0.221$  (figura 8).

Los pacientes que presentaron mala respuesta a tratamiento con una respuesta histológica de Rosen grado III y Pgp negativo presentaron una sobrevida de 85.7% a 10 años, mientras que los pacientes que expresaron Pgp y tuvieron una respuesta histológica de Rosen grado I y II tuvieron una sobrevida de 36.4% a 10 años con una  $p=0.583$  (figura 9 a y b).

Se realizó asociación entre las sobrevidas y el sexo de los pacientes encontrando una sobrevida estimada de 41% a 10 años en los pacientes masculinos y 50% a 10 años en los femeninos con una  $p= 0.547$  sin encontrar asociación estadística significativa (figura 3).

En cuanto a la asociación entre la localización y sobrevida se observó la peor sobrevida en aquellos que se presentaron en tibia y radio con una estimación de 0 meses en cada uno (figura 4).

En cuanto a la histología presentaron los osteoblásticos presentaron una sobrevida de 64.7% a 10 años, los ondroblásticos de 33.3% a 10 años y los telangiectásicos de 33.3% a 10 años con una  $p=0.78$  (figura 5).

De acuerdo a la presencia de metástasis al diagnóstico la para los OS localizados fue de 76.5% a 10 años y de 11.1% a 10 años para los metastásicos con una  $p=0.028$  (figura 6).

De acuerdo a la respuesta a tratamiento la sobrevida para los grupo I y II que representan mala respuesta a tratamiento la sobrevida a 10 años de 38.9% y de los del grupo III con buena respuesta a tratamiento 87.5% a 10 años con un  $p=0.134$  (figura 7).

## BIBLIOGRAFÍA

1. Philip A. Pizzo, David G. Poplack, Peter C. Adamson, Susan M. Blaney, Lee J. Helman, Bharat Agarwal, Anaurag K. Agrawal. Osteosarcoma: Biology, Diagnosis, Treatment, and Remaining Challenges. *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. 2011; 34: 1015-1044.
2. S Pakbaz1, S Torabi-Nezhad, F Mojtahed Jaberi, MJ Saalabian, S Rezazadeh. Clinical Significance of P-Glycoprotein Immunohistochemistry and Histomorphologic Factors in Patients with Osteosarcoma. *Iranian Red Crescent Medical Journal*; 2009; 11(3):277-285.
3. López-Aguilar, Javier Enrique; Rioscovian-Soto, Ana Paulina; Ponce de León-Herrera, María Andrea; Aguilar-Román, Berenice; Cotés-Mercado, Lourdes; Sepúlveda-Vidósola, Ana Carolina. Factores pronósticos y sobrevida en niños con sarcoma osteogénico. Experiencia de 10 años en el Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI. *Gaceta Mexicana de Oncología*; 2012; 11:300-5.
4. Hideyuki Takeshita, Mark C. Gebhardt, Dempsey S., Katsuyuki Kusuzaki, Henry J. Mankin. Experimental Models for the Study of Drug Resistance in Osteosarcoma: P-Glycoprotein-Positive, Murine Osteosarcoma Cell Lines. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 1996; 78 (3).
5. Eddy Verónica Mora, Jorge Luís Mosquera, Aldo Reigosa Y. Estudio de la expresión de la pglicoproteína y del p53 en osteosarcomas humanos. *Revista Venezolana de Oncología* 2007; 19: 2.
6. Emilios E. Pakos, John P. A. Ioannidis, The Association of P-Glycoprotein with Response to Chemotherapy and Clinical Outcome in Patients with Osteosarcoma, *CANCER* 2003; 98(3): 501-509.
7. Posl, M; Amling, M; Grahl, K; Hentz, M; Ritzel, H; Werner, M; Winkler, K, y Delling, G: P-glycoprotein expression in high grade central osteosarcoma and normal bone cells. An immunohistochemical study. *Gen Diagn Pathol*, 1997; 142: 317-325.
8. Koutarou Takazawa, Hiroyuki Tsuchiya, Ueda Yoshimichi, Yoshimitsu Kanazawa, Sadao Ii, Katsuro Tomita. Expression Analysis for the Identification of Genes Involved in acquired Resistance to Cisplatin in Osteosarcoma Cells. *Cancer Genomics & Proteomics* 2006; 3: 373-382.
9. Nicola Baldini, Katia Scotlandi, Giovanni Barbanti-Brodano, María Cristina Manara, Daniela Maurici, Gaetano Baci y cols. Expression of P-glycoprotein in high-grade osteosarcomas in relation to clinical outcome. *The New England Journal of Medicine*, 1995; 333 (21): 1380-1385.
10. Patricia Sánchez-Suárez, Luis Benítez-Bribiesca. Procesos biomoleculares de la resistencia a drogas. *Cancerología*, 2006: 1: 187-199.
11. Imanishi, T; Abe, Y; Suto, R; Higaki, S; Ueyama, Y; Nakamura, M; Tamaoki, N; Fukuda, H, e Imai, N: Expression of the multidrug resistance gene (MDR1) and prognostic correlation in human osteogenic sarcoma. *Tokai J Exp Clin Med*, 1994; 19: 39-46.

12. Julio Fernández Águila, Ofelia Crombet Ramos, Icilany Villares Álvarez y Reynaldo Pons Vázquez. Resistencia a drogas mediada por la glucoproteína P. *Revista Cubana Oncología*; 1998; 14(2):111-20.
13. Hernández Cortés, Aneiros Cachaza, Ramírez Tortosa, Nogales, O'valle Ravasa, Andújar Sánchez. Expresión inmunohistoquímica de glicoproteína P como factor pronóstico en sarcomas óseos. *Revista de Ortopedia Traumatología*; 2000; 1:41-48.
14. M. J. Ruiz Gómez, A. Souviron Rodríguez, M. Martínez Morillo. La glicoproteína-P una bomba de membrana que representa una barrera a la quimioterapia de los pacientes con cáncer. *Anales de Medicina Interna (Madrid)*, 2002; 19 (9):477-485.
15. Posl, M; Grahl, K; Amling, M; Werner, M; Ritzel, H; Stenzel, I; Hentz, M; Winkler, K, y Delling, G: P-glycoprotein expression in osteosarcomas. *Pathologie*, 1996; 17: 50-55.
16. Massimo Serra, Michela Pasello, Maria Cristina Manara, Katia Scotlandi, Stefano Ferrari, Franco Bertoni y cols. May P-glycoprotein status be used to stratify high-grade osteosarcoma patients? Results from the Italian/Scandinavian Sarcoma Group 1 treatment protocol. *International Journal Of Oncology* 2006; 29: 1459-1468.

Tabla 1. Estadística descriptiva de pacientes pediátricos con osteosarcoma del Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI

VARIABLE	PACIENTES n=26	MEDIA (100%)
<b>GÉNERO</b>		
Masculino	16	61.5
Femenino	10	38.5
<b>LOCALIZACIÓN</b>		
Fémur distal	11	42.3
Fémur proximal	5	19.2
Tibia proximal	4	15.4
Húmero	3	11.5
Tibia distal	1	3.8
Peroné	1	3.8
Radio	1	3.8
<b>HISTOLOGÍA</b>		
Osteoblástico	17	65.4
Condroblástico	3	11.5
Telangiectásico	6	23.1
<b>METÁSTASIS</b>		
Si	9	34.6
No	17	65.4
<b>RESPUESTA DE ROSEN</b>		
Grado I	7	26.9
Grado II	11	42.3
Grado III	8	30.8
Grado IV	0	0
<b>PGP</b>		
Positivo	12	46.2
Negativo	14	53.8
<b>ESTADO ACTUAL</b>		
Vivo	14	53.8
Fallecido	12	46.2

Tabla 2. Factores asociados con el estado actual de los pacientes pediátricos con osteosarcoma del Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI.

VARIABLE	VIVO n=14 (53.8%)	MUERTO n=12 (46.2%)	<i>p</i>	<i>OR</i>	<i>IC</i>
<b>GÉNERO</b>					
Masculino	8 (57.1)	8 (66.6)	0.619	2.4	0.701-0.464
Femenino	6 (42.8)	4 (33.3)			
<b>HISTOLOGÍA</b>					
Osteoblástico	11(78.5)	6(50)	0.312	2.3	0.308-0.158
Condrolástico	1(9)	2(16.6)			
Telangiectásico	2(14.2)	4(33.3)			
<b>METÁSTASIS</b>					
Si	1(7.1)	8 (66.6)	0.001	10.1	2.451-275.826
No	13(92.8)	4 (33.3)			
<b>RESPUESTA DE ROSEN</b>					
Grado I y II	7(50)	11 (91.6)	0.000	11	1.103-109.674
Grado III	7 (50)	1 (8.3)			
<b>Pgp</b>					
Positivo	5 (35.7)	7 (58.3)	0.249	0.397	0.81-1.936
Negativo	9 (64.2)	5 (35.7)			

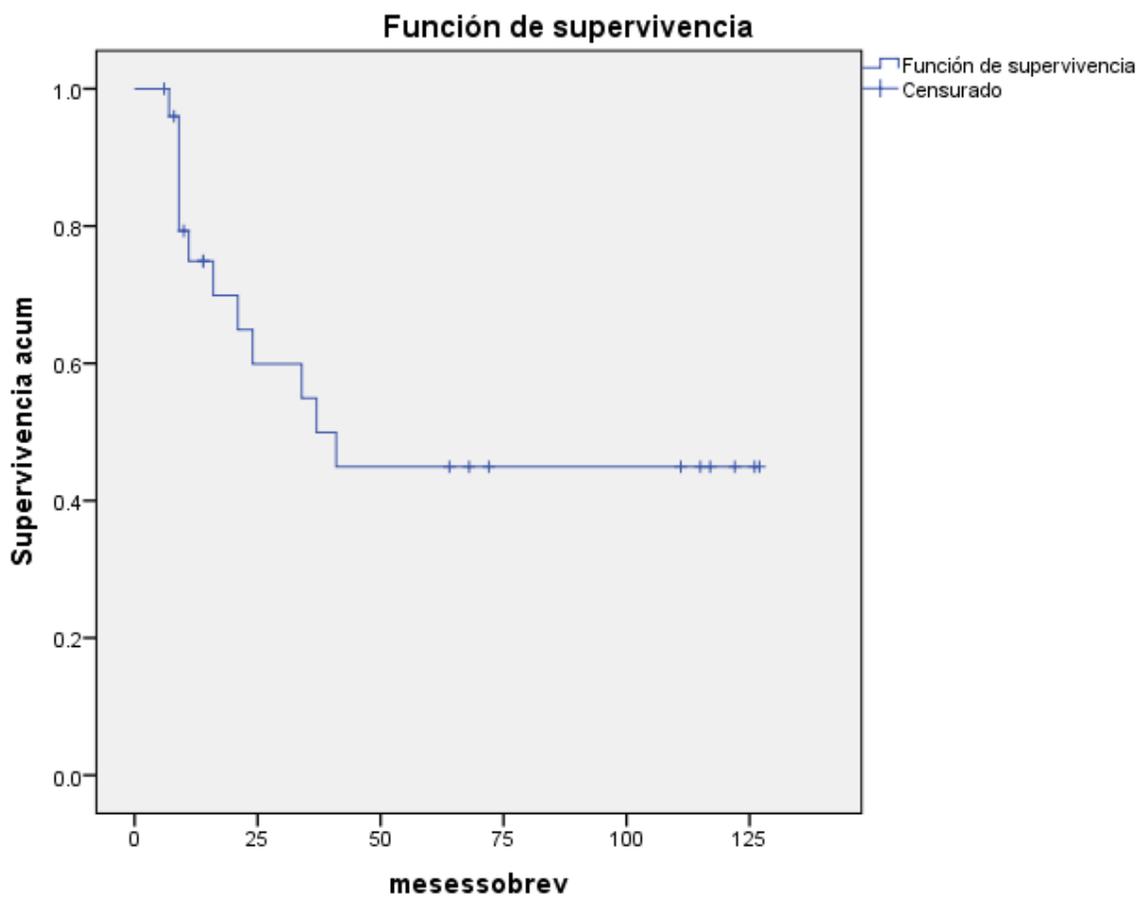


Figura 1. Sobrevida global a 120 meses

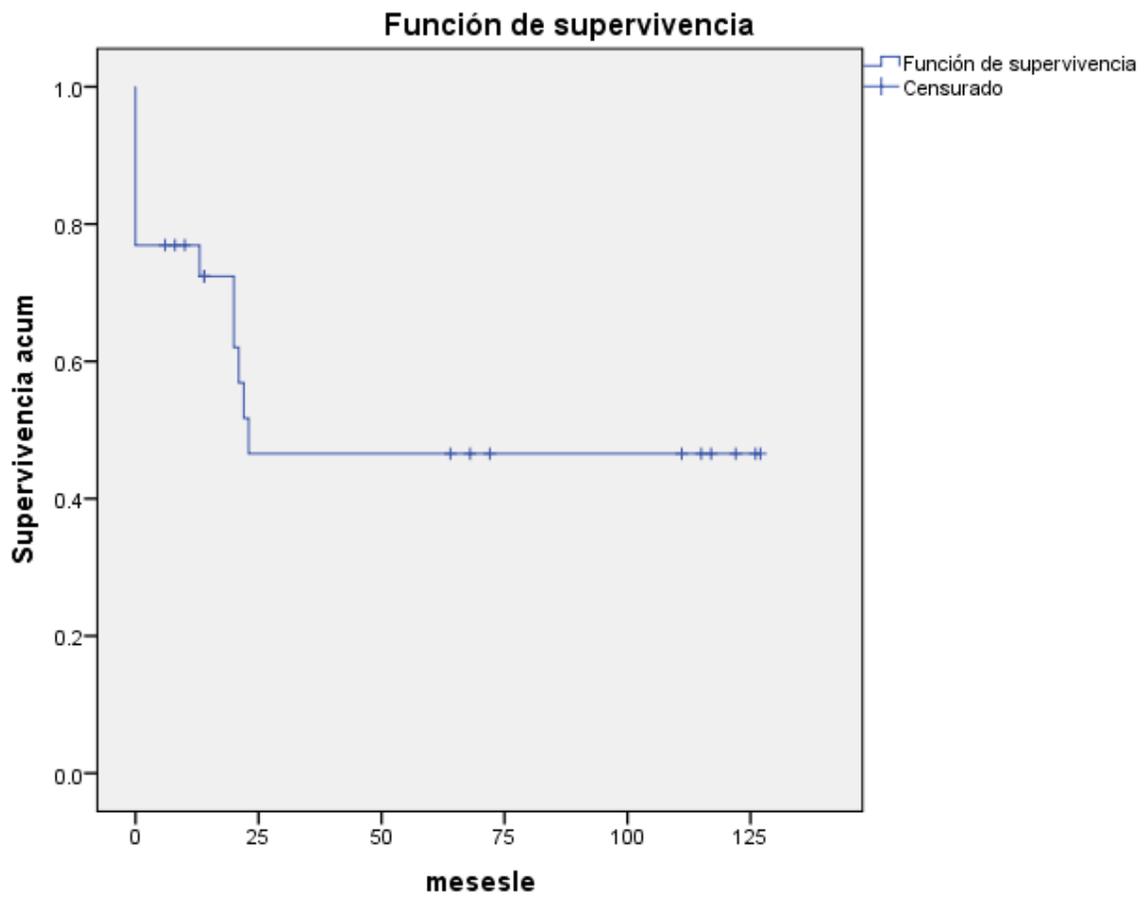


Figura 2. Sobrevida libre de enfermedad.

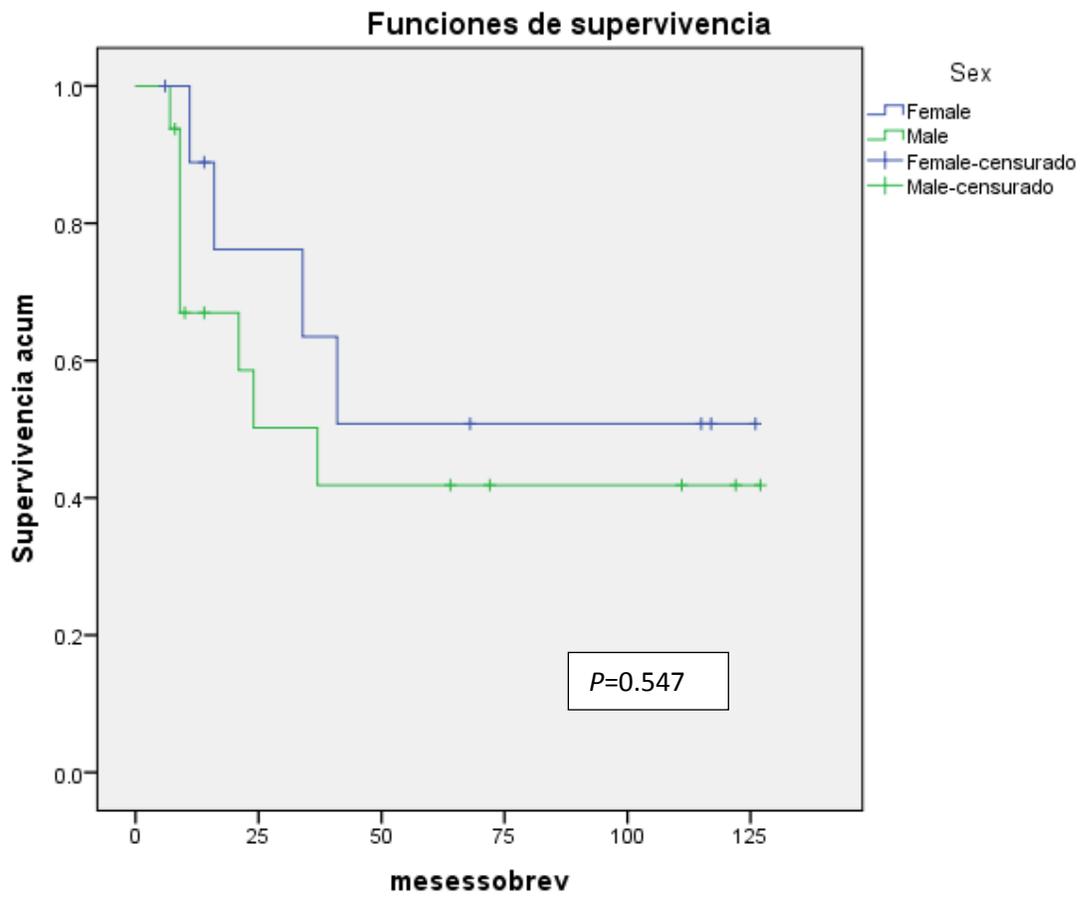


Figura 3. Sobrevida por género

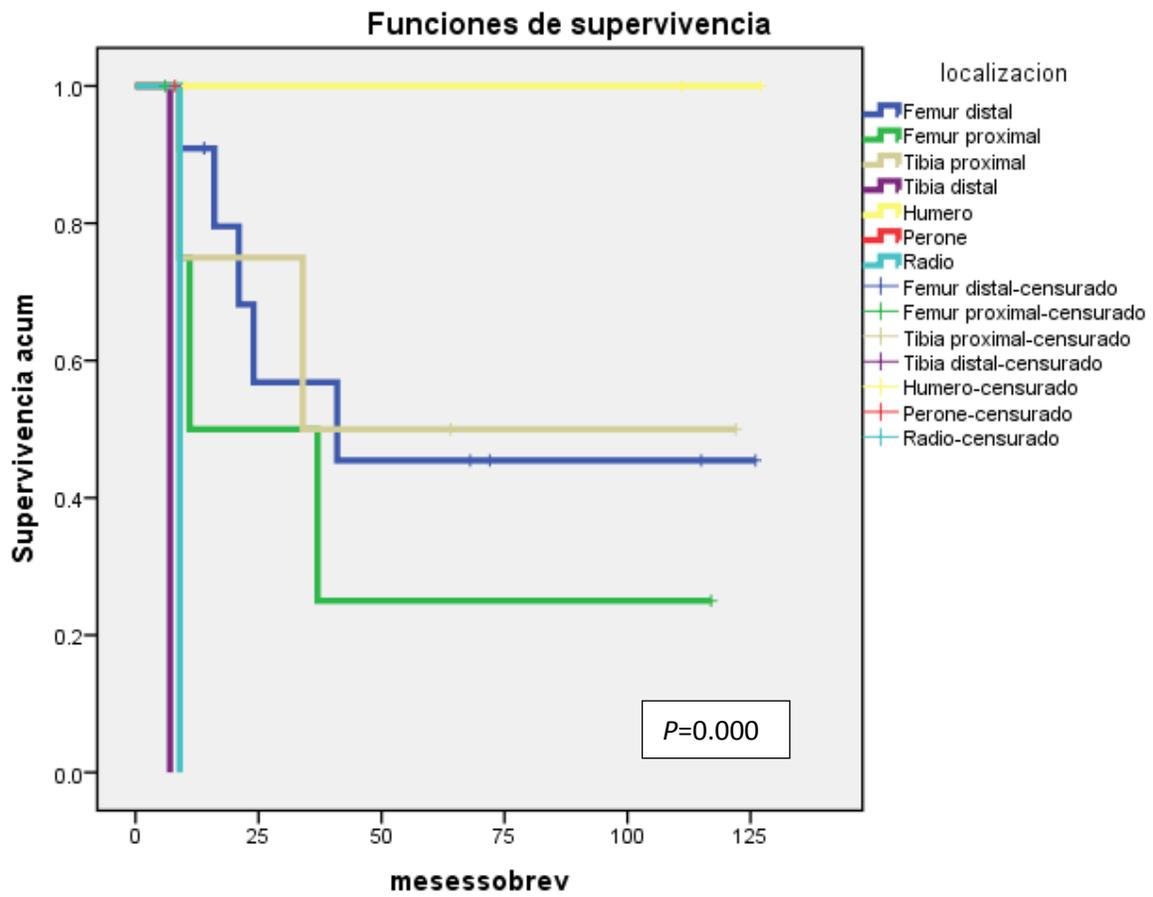


Figura 4. Sobrevida de acuerdo a la localización

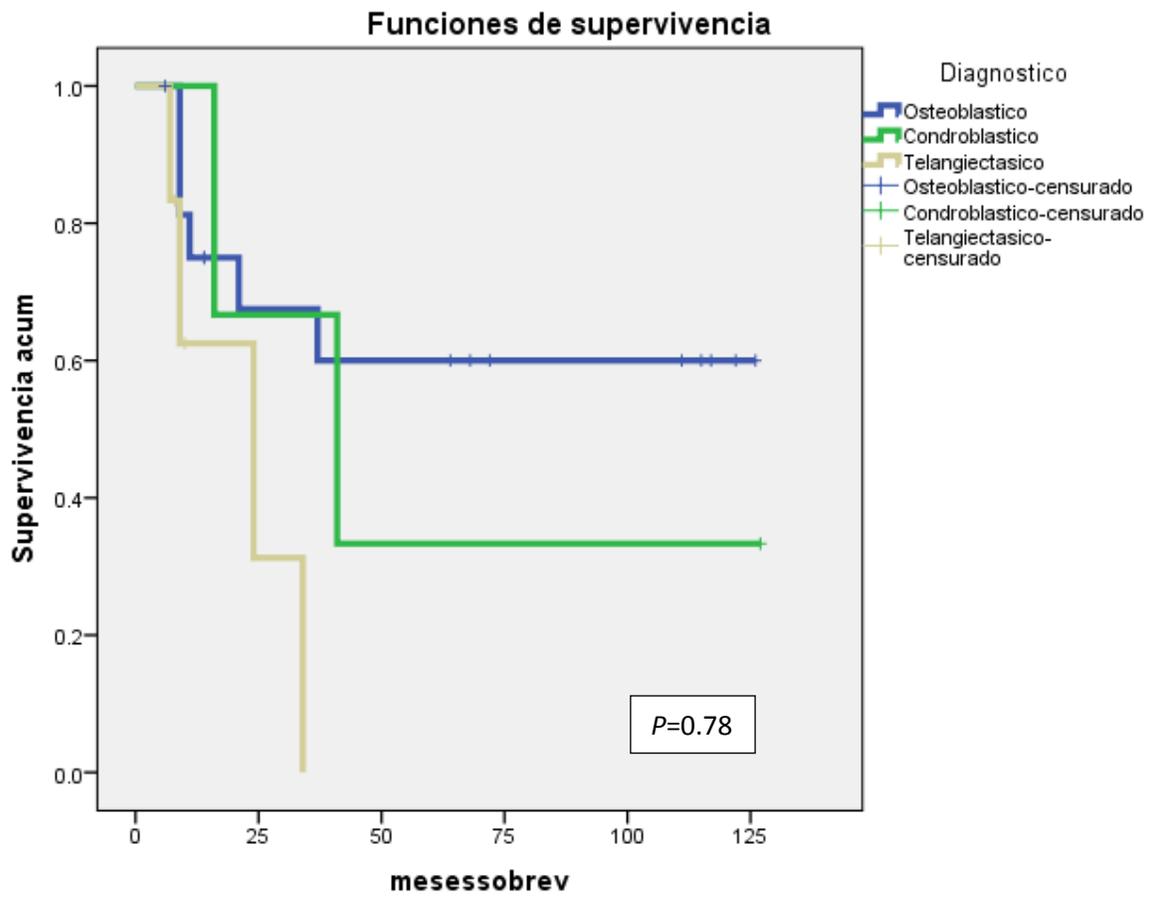


Figura 5. Sobrevida de acuerdo a histología

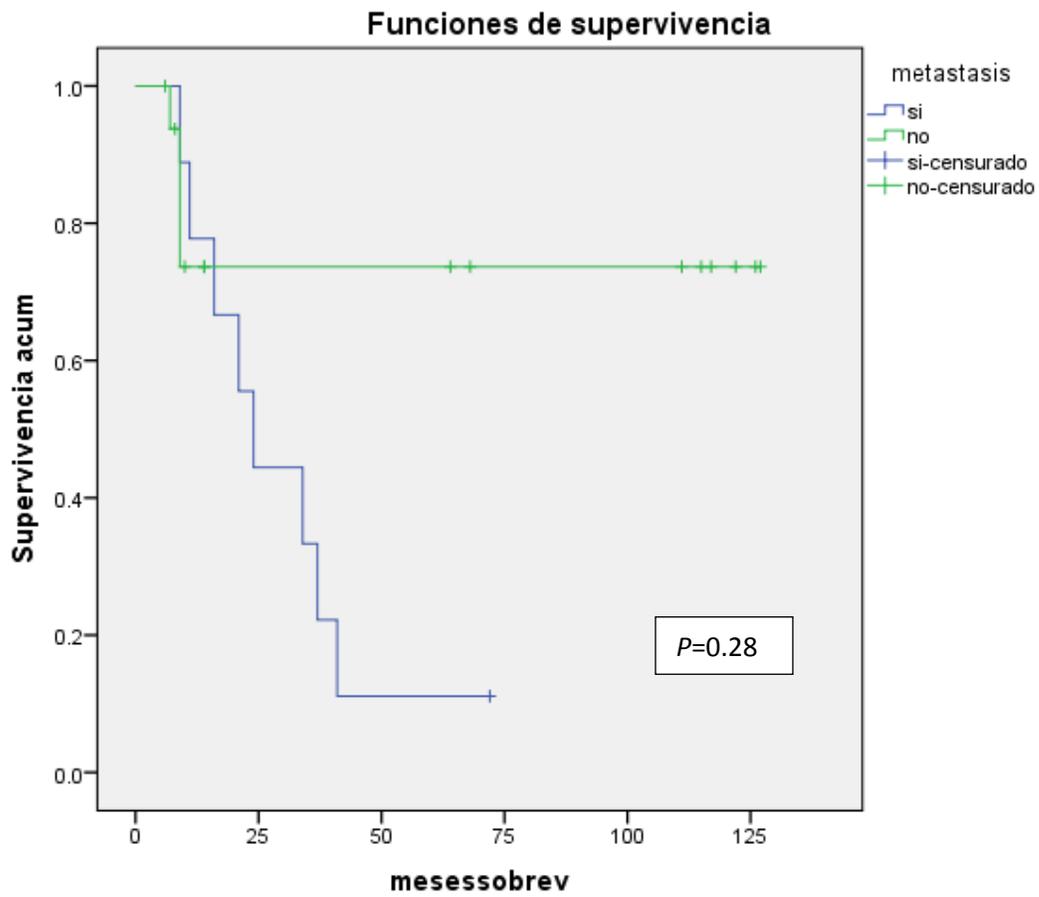


Figura 6. Sobrevida de acuerdo a la presencia de metástasis al diagnóstico

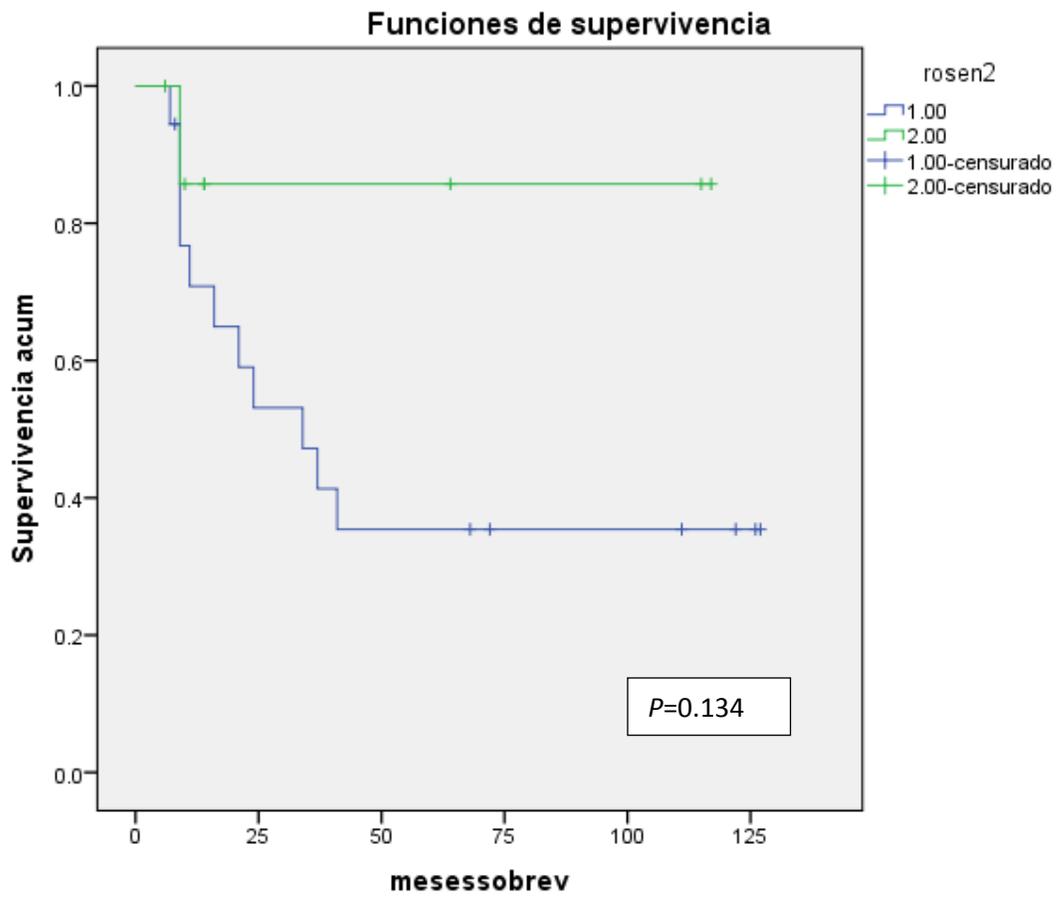


Figura 7. Sobrevida de acuerdo a respuesta histológica de Rosen

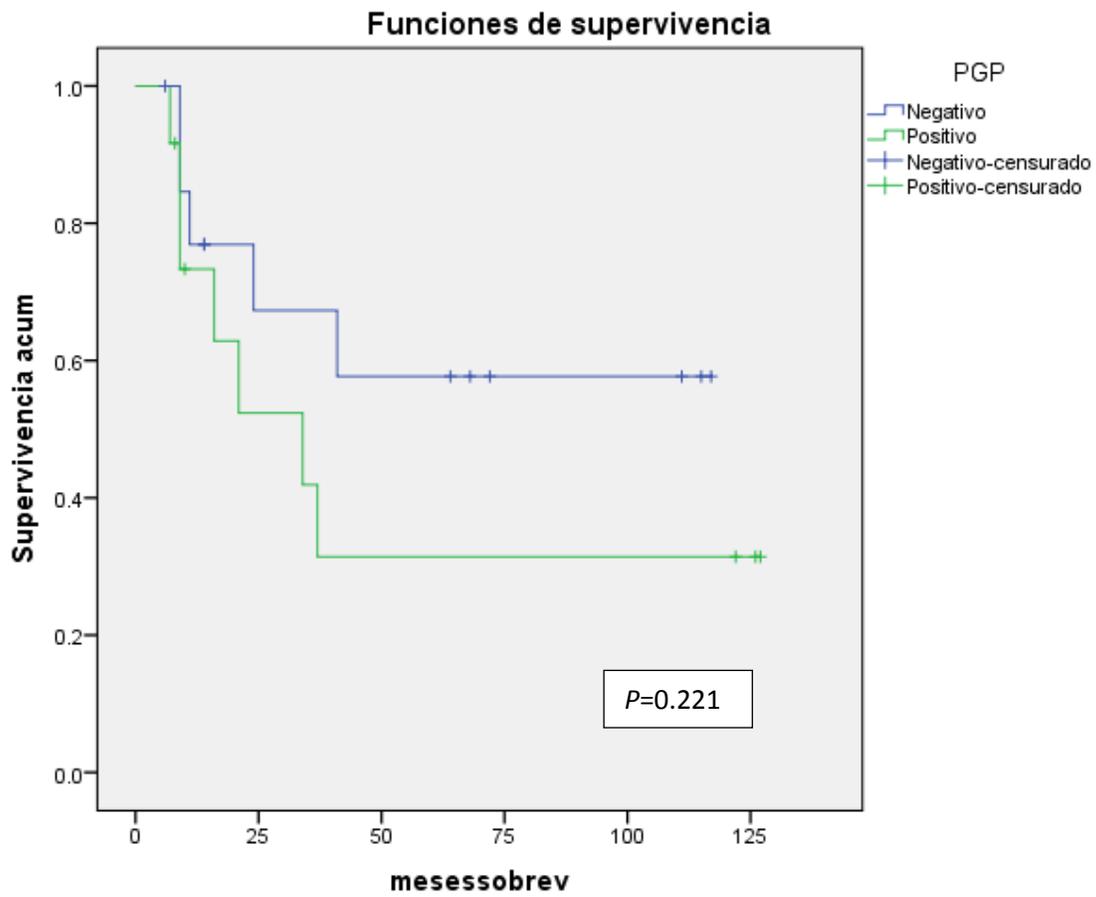
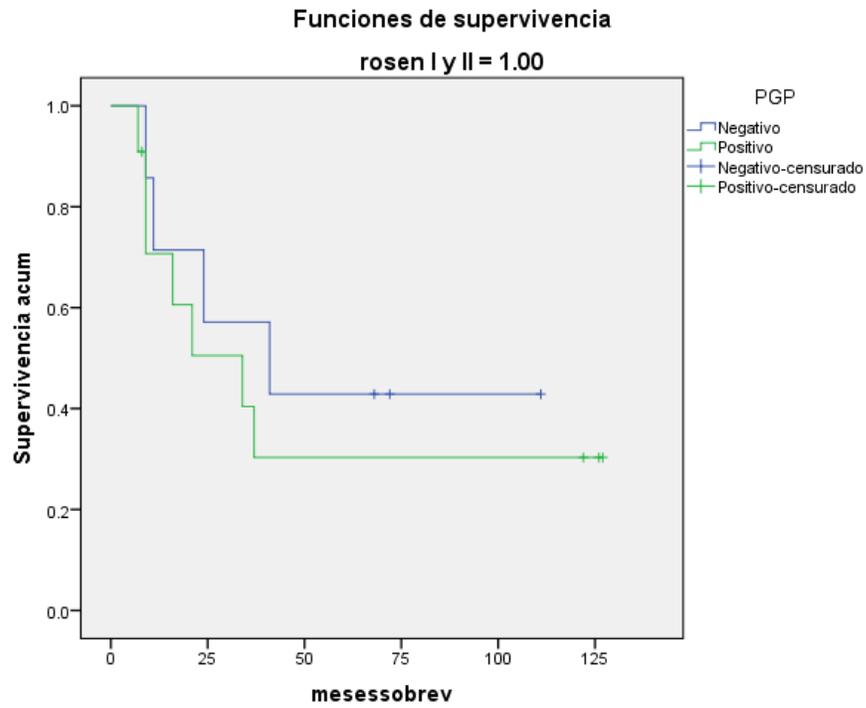


Figura 8. Sobrevida de acuerdo a expresión de Pgp



$P=0.583$

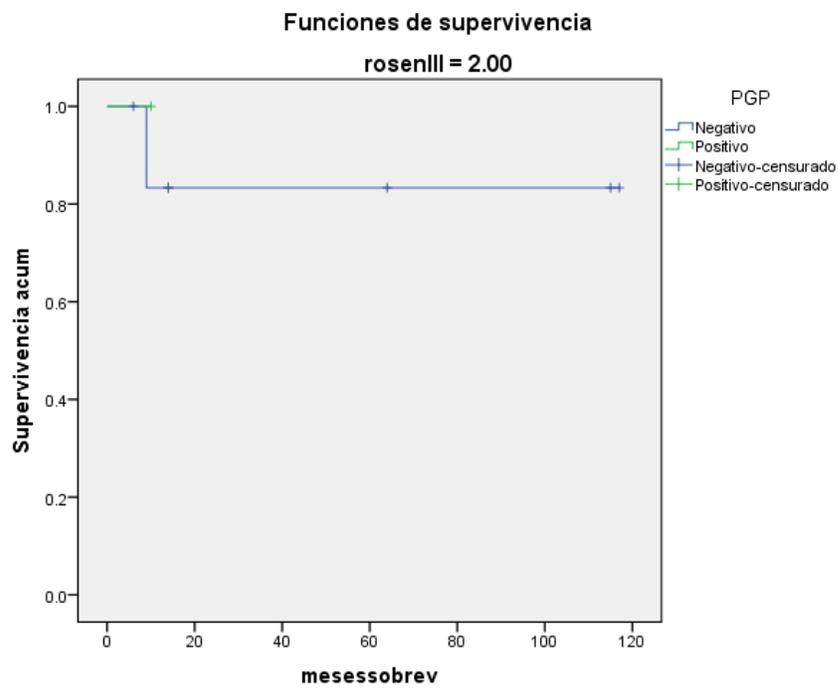


Fig. 9 a y b Sobrevida de acuerdo a respuesta histológica de Rosen y expresión de Pgp.

