

ESTUDIO DE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR EN ASTROCITOMAS INFILTRANTES DIFUSOS

TESIS UAB 2015



Elena A. Martínez Sáez



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**Departament de Ciències Morfològiques
Facultat de Medicina**

**ESTUDIO DE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR EN
ASTROCITOMAS INFILTRANTES DIFUSOS**

Memoria de tesis doctoral presentada por Elena Antima Martínez Sáez para optar al grado de doctora por la Universitat Autònoma de Barcelona.

Trabajo realizado en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Vall d'Hebron, bajo la dirección del Dr. Santiago Ramón y Cajal Agüeras y el Dr. Joan Carles Ferreres Piñas.

Barcelona, 2015

Doctoranda

Director

Codirector

Elena Antima
Martínez Sáez

Santiago
Ramón y Cajal
Agüeras

Joan Carles
Ferreres Piñas

Barcelona, 2015

El Dr. Santiago Ramón y Cajal Agüeras, catedrático del Departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona y Jefe de Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Vall d'Hebron,

CERTIFICA:

Que Doña Elena Antima Martínez Sáez ha realizado bajo la dirección de los abajo firmantes el trabajo de investigación correspondiente a la tesis doctoral:

**ESTUDIO DE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR EN ASTROCITOMAS
INFILTRANTES DIFUSOS**

Revisado el presente trabajo, estimo que corresponde fielmente a los resultados obtenidos y quedo conforme con su presentación para ser juzgado por el tribunal que sea designado para su lectura.

Dr. Santiago Ramón y Cajal
Barcelona, 2015

Directores de la tesis:

Dr. Santiago Ramón y Cajal Agüeras

Departamento Anatomía Patológica
H. U, Vall d'Hebron, Barcelona

Dr. Joan Carles Ferreres Piñas

Departamento Anatomía Patológica
H. U, Vall d'Hebron, Barcelona

A Guille, Hugo y Vicente
A mis padres y hermano
A mis abuelos

“The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds the most discoveries is not “Eureka!” but “that’s funny...”

Atribuido a Isaac Asimov (1920-1992)

ÍNDICE

ABREVIATURAS	XV
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. Astrocitomas infiltrantes difusos	4
<i>I.1.a. Características anatomo-patológicas de los astrocitomas infiltrantes difusos</i>	4
<i>I.1.b. Epidemiología de los astrocitomas infiltrantes difusos</i>	13
<i>I.1.c. Presentación clínica y radiológica de los astrocitomas infiltrantes difusos</i>	14
<i>I.1.d. Comportamiento biológico de los astrocitomas infiltrantes difusos</i>	19
<i>I.1.e. Alteraciones moleculares de los astrocitomas infiltrantes difusos</i>	20
<i>I.1.f. Clasificación molecular basada en perfiles de expresión génica: subtipos de glioblastoma proneural, neural, clásico y mesenquimal</i>	21
I.2. Vías de señalización celular en la transformación neoplásica	31
<i>I.2.a. Concepto de vías de señalización celular</i>	32
<i>I.2.b. Vía de RAS-Raf-MAPK</i>	33
<i>I.2.c. Vía de PI3K-AKT-mTOR</i>	34
<i>I.2.d. Traducción proteica</i>	36
II. HIPÓTESIS	39
III. OBJETIVOS	43
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	47
<i>IV.1. Selección de los casos a estudio</i>	49
<i>IV.2. Recogida de datos clínico-radiológicos</i>	50
<i>IV.3. Estudio inmunohistoquímico</i>	51
<i>IV.4. Estudio mutacional</i>	53
<i>IV.5. Análisis estadístico</i>	55

V. RESULTADOS	57
V.1. Parámetros clínico-patológicos	59
<i>V.1.a. Edad y sexo</i>	59
<i>V.1.b. Tipo de cirugía</i>	60
<i>V.1.c. Localización de la lesión</i>	60
<i>V.1.d. Supervivencia</i>	62
V.2. Análisis de las vías de señalización y estudio de la proliferación celular en astrocitomas infiltrantes difusos	63
<i>V.2.a. EGFR</i>	63
<i>V.2.b. PTEN</i>	65
<i>V.2.c. pMAPK</i>	67
<i>V.2.d. p4E-BP1</i>	71
<i>V.2.e. 4E-BP1</i>	74
<i>V.2.f. pℓF4E</i>	76
<i>V.2.g. eIF4E</i>	79
<i>V.2.h. pS6</i>	82
<i>V.2.i. Ciclina D1</i>	84
<i>V.2.j. Ki67</i>	87
<i>V.2.l. Valoración conjunta de distintas proteínas</i>	89
V.3. Glioblastomas secundarios	90
V.4. Tablas resumen	92
VI. DISCUSIÓN	95
VII. CONCLUSIONES	113
VIII BIBLIOGRAFIA	117
IX. AGRADECIMIENTOS	129

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

4E-BP1: proteína de unión a 4E-1
AA: astrocitoma anaplásico
AD: astrocitoma difuso
ADN: ácido desoxirribonucleico
AID: astrocitomas infiltrantes difusos
AP: astrocitoma pilocítico
ARN: ácido ribonucleico
ARNm: ácido ribonucleico mensajero
CDK: quinasa dependiente de ciclina
E: especificidad
EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor receptor*)
eIF4E: factor eucariota de iniciación de la traducción 4E
ERK: quinasa reguladora de señales extracelulares (Extracellular signal-Regulated Kinase)
GBCG: glioblastoma de células gigantes
GBM: glioblastoma
GFAP: proteína glial fibrilar ácida
GS: gliosarcoma
IC95%: intervalo de confianza del 95%
IDH: isocitrato deshidrogenasa
LOH: pérdida de heterocigosidad
MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase
MEK: proteína quinasa activada por mitógenos
MGMT: O⁶-metilguanin-DNA metiltransferasa
OMS: Organización Mundial de la Salud
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PIC: presión intracraneal
PTEN: homólogo de tensina y fosfatasa (*phosphatase and tensin homolog*)
RM: resonancia magnética
S: sensibilidad
TC: tomografía computerizada
VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular (*vascular endothelial growth factor*)
VPN: valor predictivo negativo
VPP: valor predictivo positivo
mTOR: mammalian target of rapamicin
PI3K: fosfatidil-inositol-3 quinasa

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

Descritos en 1860 por el patólogo alemán Rudolf Virchow, los gliomas son los tumores intraaxiales primarios más frecuentes. Se dividen en tres grandes grupos en función de la célula de la macroglía a la que se asemejan morfológicamente: astrocitomas, oligodendrogliomas y ependimomas.

El primer intento de clasificación de estos tumores lo hicieron Bailey y Cushing en 1926¹. El concepto de que distintas morfologías implicaban distintos grados de diferenciación histológica y de malignidad lo desarrollaron Kernohan y cols en 1949². Después de distintos sistemas de clasificación (Ringertz, Ste Anne-Mayo), actualmente se utiliza de manera sistemática la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS), publicada en 1979 y revisada en 1993, 2000 y 2007³. Este sistema reconoce gliomas de bajo grado (grados I y II) y de alto grado (III y IV), combinando la nomenclatura del tumor con un grado implícito, de manera que el diagnóstico histológico correlaciona con el grado histológico del tumor.

Los astrocitomas suponen la mayoría de gliomas. Se distinguen dos grandes grupos de astrocitomas en función de su patrón de crecimiento: astrocitomas infiltrantes difusos (AID), que crecen infiltrando de manera difusa el parénquima cerebral, sin bordes fácilmente delimitables, y los bien circunscritos (de bordes bien delimitados). Los AID constituyen la gran mayoría de tumores gliales, con distintos grados de malignidad: astrocitomas difusos grado II (AD), astrocitomas anaplásicos grado III (AA) y glioblastomas grado IV (GBM, los más frecuentes). Son lesiones de difícil tratamiento quirúrgico debido a su carácter infiltrante difuso, y gran morbi-mortalidad, que varía en función de su localización. Los astrocitomas bien circunscritos son tumores de, en principio, mejor pronóstico que los difusos debido no sólo al menor grado histológico (en general bajo grado, con raros ejemplos de lesiones anaplásicas, grado III), sino también a una resección quirúrgica que puede ser completa con mayor frecuencia. El astrocitoma pilocítico (AP), grado I de la clasificación de la OMS, es el astrocitoma bien circunscrito más frecuente, suele afectar a niños y ser infratentorial.

INTRODUCCIÓN

I.1. Astrocitomas infiltrantes difusos

I.1.a. Características anatómo-patológicas de los astrocitomas infiltrantes difusos

Los astrocitomas infiltrantes difusos representan la mayoría de los gliomas; son proliferaciones de células con núcleos hipercromáticos, alargados o irregulares, con citoplasma eosinófilo que expresa proteína glial (GFAP). Crecen infiltrando el tejido cerebral sano, sin ejercer prácticamente efecto masa en las primeras fases de su crecimiento. Se localizan principalmente en sustancia blanca de hemisferios cerebrales, pero pueden darse ocasionalmente en sustancia gris u otras localizaciones.

Aspecto macroscópico

Macroscópicamente los astrocitomas difusos y anaplásicos presentan un aspecto similar, con un crecimiento difuso que provoca un borramiento de los límites entre estructuras anatómicas fácilmente discernibles en situación de normalidad. No se observa destrucción de las estructuras afectadas, sino ensanchamientos, presencia de microquistes que confieren un aspecto esponjoso, áreas granulares o cambios en la consistencia del tejido (aumento o disminución). Si las zonas microquísticas son extensas, pueden presentar un aspecto gelatinoso. Las calcificaciones pueden darse, si bien con menos frecuencia que en otros tipos histológicos como el oligodendroglioma. En el caso del AA, la formación de microquistes es menos frecuente y suelen aparecer masas tumorales con bordes delimitables debido a la mayor densidad celular^{3,4}.

La superficie de corte de los GBM suele ser heterogénea, con cambios de coloración y consistencia, con áreas grisáceas de consistencia blanda y áreas amarillentas que corresponden a necrosis tisular. Se pueden encontrar además áreas rojizas o marronáceas correspondientes a hemorragias más o menos antiguas. La necrosis y la hemorragia pueden representar amplias zonas de la lesión, haciendo difícil la identificación de tejido tumoral viable (fig. 1.1). Pueden existir lesiones quísticas que contienen un fluido turbio correspondiente a tejido necrótico licuefactado, a diferencia del fluido transparente de los quistes de retención del AD.

Los AID de hemisferios cerebrales de cualquier grado suelen ser unilaterales pero puede haber extensión contralateral a través del cuerpo calloso o de las columnas del fórnix. Aquéllos de troncoencéfalo suelen ser bilaterales y simétricos. El AD se localiza con mayor frecuencia en la zona supratentorial, en lóbulos frontales y

temporales, tanto en niños como en adultos. Las localizaciones que siguen a ésta en frecuencia son el troncoencéfalo y la médula espinal, siendo muy infrecuente en cerebelo.

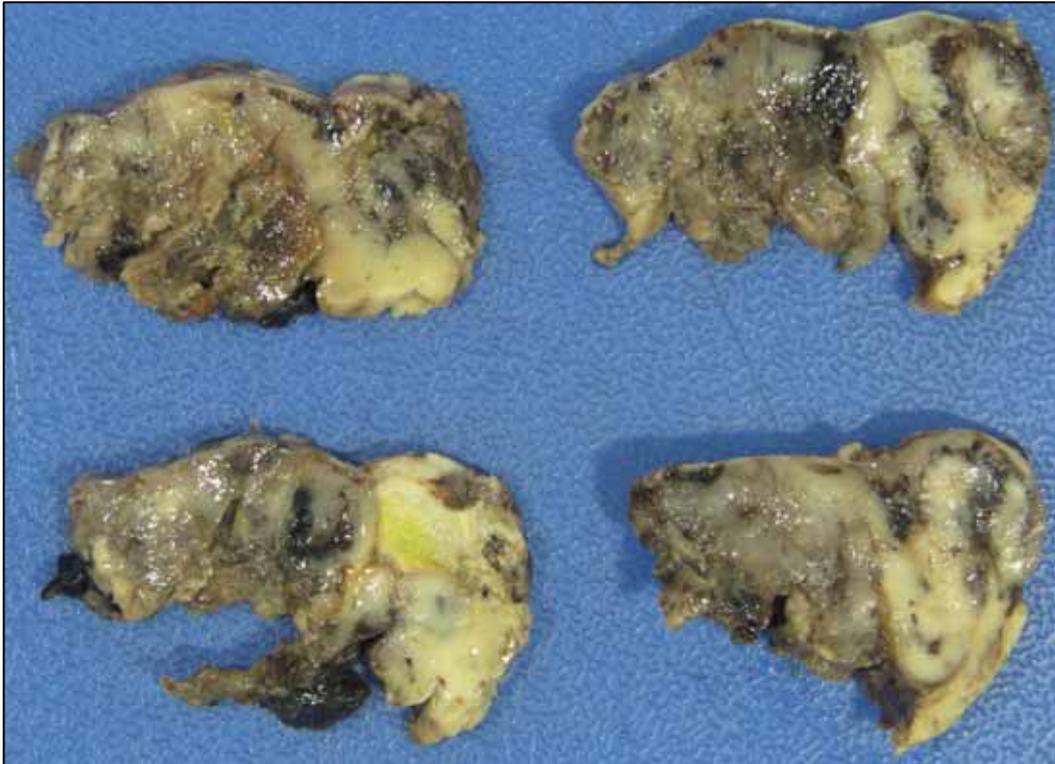


Figura 1.1. Pieza de resección de GBM en la que se observa una lesión heterogénea, que alcanza superficie subpial y margen de resección profundo, con áreas amarillentas-anaranjadas, irregulares, sugestivas de necrosis, y áreas de corteza macroscópicamente identificable.

Características histológicas

ASTROCITOMA DIFUSO

Histológicamente el astrocitoma difuso, grado II, es una lesión hiper celular compuesta por astrocitos neoplásicos bien diferenciados con atipia nuclear ocasional, sin que exista actividad mitótica, necrosis o proliferación vascular. Las células tumorales son astrocitos fibrilares o gemistocíticos (células astrocitarias con citoplasma eosinófilo prominente, bien delimitado, con núcleo lateralizado), sobre un fondo laxo que presenta microquistes con relativa frecuencia. La densidad celular es moderadamente mayor que el tejido cerebral normal, con atipia nuclear ocasional. El diagnóstico diferencial puede plantearse, en lesiones donde la hiper celularidad es discreta, con un parénquima cerebral normal, o bien con situaciones de reactividad (gliosis reactiva). La lesión neoplásica presentará en principio mayor monotonía nuclear que la gliosis³.

INTRODUCCIÓN

Se distinguen tres variantes histológicas de AD, según el tipo celular prevalente: astrocitoma fibrilar, astrocitoma gemistocítico y astrocitoma protoplásmico.

El **astrocitoma fibrilar** es la variante más frecuente, compuesta principalmente por astrocitos fibrilares (fig. 1.2). La atipia nuclear (núcleos alargados, en forma de cigarro-puro o hipercromáticos e irregulares) es la principal característica que diferencia las células neoplásicas de las normales o reactivas. Los citoplasmas celulares pueden ser escasos y difícilmente discernibles, dando a veces un aspecto de núcleo desnudo, formando un fondo laxo en las zonas más celulares, con frecuente formación de microquistes con contenido mucinoso.

Conceptualmente todos los astrocitomas difusos muestra expresión de S100 (a nivel de citoplasma o núcleo)⁴. El estudio inmunohistoquímico con GFAP muestra una expresión constante de dicha proteína en estos tumores (aunque no en todas las células tumorales), con una positividad difusa en la matriz fibrilar de fondo.

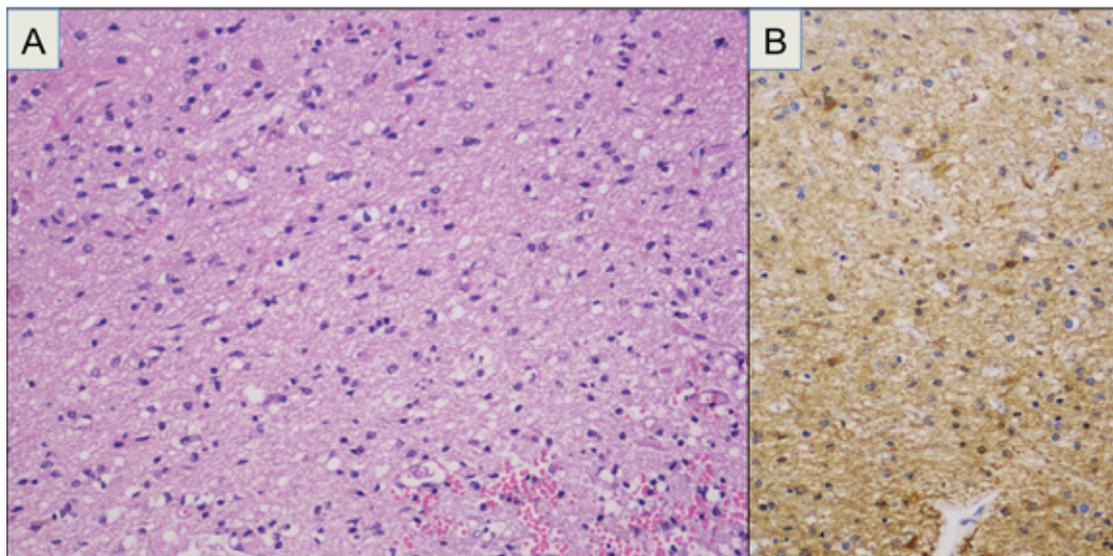


Figura 1.2. Astrocitoma fibrilar. Proliferación moderadamente celular de núcleos alargados, irregulares, de aspecto astrocitario (A, hematoxilina-eosina) con una fina trama de proteína glial de fondo (B, GFAP). 200x.

El **astrocitoma gemistocítico** se caracteriza morfológicamente por la presencia (en proporción variable) de astrocitos gemistocíticos anaplásicos. Se considera que éstos deben suponer al menos un 20% de la población celular neoplásica para establecer un diagnóstico de esta variante de astrocitoma³. Estas células presentan un citoplasma amplio, eosinófilo, angulado, en vidrio esmerilado, con núcleo excéntrico y unos procesos citoplásmicos cortos, que pueden ser finos o gruesos (a diferencia de los minigemistocitos del oligodendroglioma). Con frecuencia estas lesiones presentan manguitos linfocitarios perivasculares (fig. 1.3).

Además de las células gemistocíticas se identifican unas células con poco citoplasma y núcleo hipercromático de mayor tamaño, distribuidas de manera difusa en la lesión, que presentan mayor actividad proliferativa que la población de gemistocitos. La presencia de estas células es un signo de progresión a malignidad y otorga a estos tumores una mayor tendencia a la progresión respecto a otras variantes morfológicas de AD. No obstante, la designación de un grado III está condicionada por la presencia o ausencia de figuras mitóticas en la lesión, por lo que si no se encuentran, la lesión corresponderá todavía a un grado II de malignidad.

Los gemistocitos expresan de manera constante GFAP, con una actividad proliferativa media inferior al 4% (significativamente menor a la de las células con ratio núcleo:citoplasma elevado). Se encuentra con frecuencia expresión nuclear de p53 y bcl2 en esta variante de AD³.

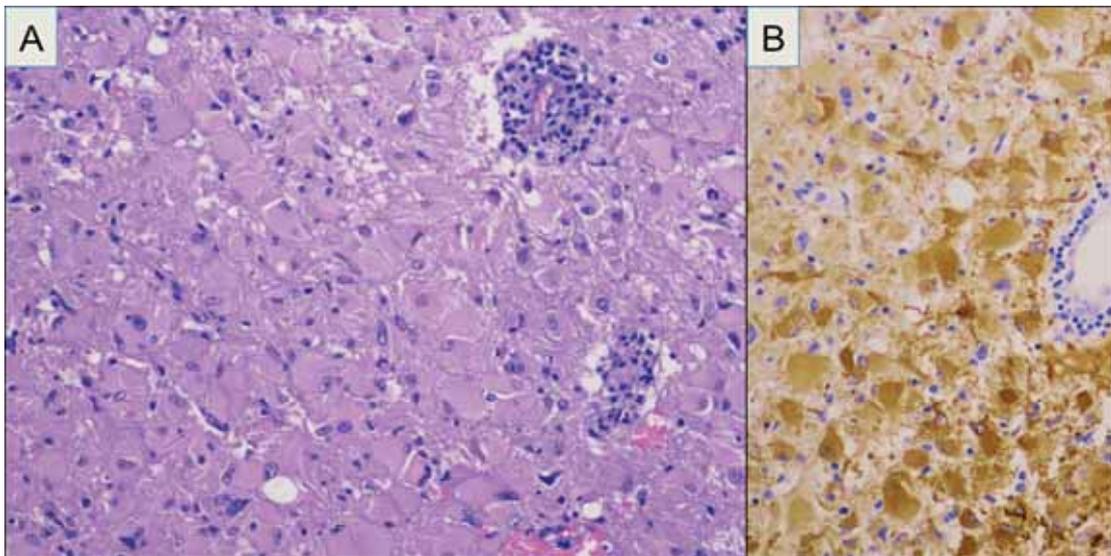


Figura 1.3. Astrocitoma gemistocítico. Células de citoplasmas amplios, eosinófilos, angulados, con manguitos linfocitarios (A, hematoxilina-eosina) y expresión de GFAP en los citoplasmas de estas células (B). 200x.

El **astrocitoma protoplásmico** es una entidad infrecuente, caracterizada por la formación de microquistes y degeneración mucoide. La densidad celular es baja, y se compone principalmente de astrocitos con escaso citoplasma fibrilar, con núcleos monótonos redondos-ovales, y ausencia de actividad mitótica. Las células muestran escasa expresión de GFAP y el índice mitótico es inferior al 1%. Se localiza preferentemente en región fronto-temporal, y para algunos autores es más un patrón histológico poco frecuente que una variante de diagnóstico reproducible.

INTRODUCCIÓN

ASTROCITOMA ANAPLÁSICO

El astrocitoma anaplásico, AID grado III de la clasificación de la OMS³, presenta mayor densidad celular que el AD, mayor pleomorfismo e hiperchromasia nuclear y actividad mitótica (fig. 1.4.A). La evaluación de la actividad mitótica ha de hacerse teniendo en cuenta el tamaño del material que se está valorando, de manera que una única mitosis es suficiente para dar un diagnóstico de AA en una biopsia estereotáxica, pero no en una pieza de gran tamaño. La presencia de necrosis y proliferación vascular (ya sea como hiperplasia endotelial o como proliferación microvascular) descartan el diagnóstico de AA. Pueden existir sin embargo vasos prominentes y grupos de delicados capilares, revestidos por una única capa de células endoteliales.

El diagnóstico de AA puede hacerse en un paciente previamente diagnosticado de AD, que progresa, o directamente en una primera biopsia. Puede ocurrir que el material no sea representativo de la totalidad de la lesión, y que los hallazgos morfológicos en el material estudiado no sean extrapolables a las zonas no estudiadas.

El estudio inmunohistoquímico de estas lesiones muestra expresión de GFAP (fig. 1.4.B) y S100. La expresión de vimentina es de poca utilidad diagnóstica, pero sirve para validar el estado antigénico de la muestra. La actividad proliferativa en los AA es muy variable, con valores que pueden estar en el rango de los AD pero también en el de los GBM.

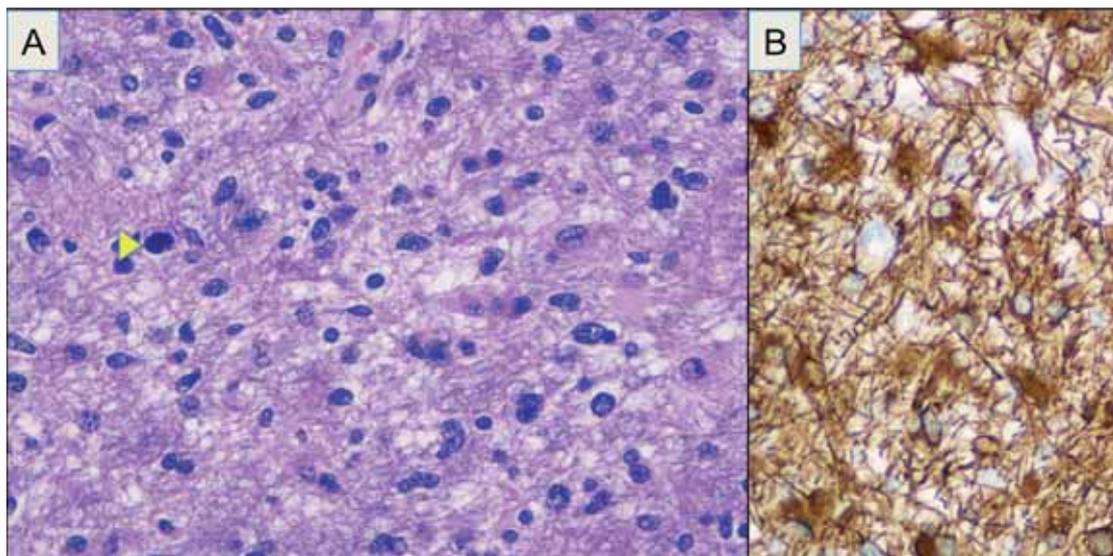


Figura 1.4. Astrocitoma anaplásico. A. Lesión astrocitaria hiper celular con mitosis (mitosis en campo señalada por cabeza de flecha amarilla). HE, 400x. B. Densa trama de proteína glial. GFAP, 400x.

GLIOBLASTOMA

El glioblastoma corresponde al extremo más alto del espectro de malignidad de los AID. Es el más frecuente de los tumores cerebrales primarios, y se caracteriza histológicamente por atipia nuclear, pleomorfismo celular, actividad mitótica, trombosis vascular, proliferación vascular y necrosis (fig. 1.5)^{3,4}. La gran mayoría de estos tumores muestran una marcada heterogeneidad morfológica (de ahí el adjetivo “multiforme”), de manera que es difícil establecer un patrón típico que los englobe a todos.

Los rasgos morfológicos que los definen y diferencian de astrocitomas de menor grado son la presencia de necrosis y de proliferación vascular. Para un diagnóstico de GBM se ha de encontrar al menos una de estas dos características.

La necrosis es el hallazgo morfológico que con mayor fuerza se asocia a una corta supervivencia. Puede encontrarse como grandes zonas necróticas de bordes geográficos, o la característica necrosis en pseudoempalizada (zona necrótica central rodeada por células tumorales, de manera que los núcleos de éstas se disponen más o menos a la misma distancia del centro de la necrosis, adoptando una apariencia en empalizada que no es real, fig. 1.5.A). Actualmente existen distintas teorías para explicar este fenómeno. Por un lado, el rápido crecimiento de la lesión provoca que en algunas zonas las necesidades metabólicas superen el aporte nutricional que reciben. Por otro lado, el estado procoagulante en que se encuentran los pacientes con gliomas de alto grado (por la secreción de factores procoagulantes por parte de las células tumorales) favorece las trombosis vasculares, dando lugar a grandes zonas necróticas. Sin embargo parece existir un componente migratorio: como respuesta a la hipoxia, algunos de los clones tumorales adquieren características moleculares que permiten una migración más activa. Esto hace que las células abandonen el área central más susceptible a hipoxia, que queda acelular^{5,6}.

Se admiten, como criterio diagnóstico de GB, dos formas de proliferación vascular: la proliferación microvascular y la hiperplasia endotelial. La proliferación microvascular (más frecuente) está compuesta por masas globulares con pequeñas luces vasculares irregulares que recuerdan a los glomérulos renales (fig. 1.5.C y D). Suele encontrarse alrededor de las áreas de necrosis, incluso con cierta disposición radial hacia el centro de la necrosis. Estas formaciones aparecen en respuesta a la liberación de factores tisulares como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) por parte de las células tumorales isquémicas^{5,6}. Están compuestas por células endoteliales, pero también proliferan las células de músculo liso y los pericitos.

INTRODUCCIÓN

La segunda forma aceptada de proliferación vascular diagnóstica de GBM es la hiperplasia endotelial, que puede afectar a vasos de pequeño y mediano tamaño. Consiste principalmente en la proliferación y aumento de tamaño de las células endoteliales, quedando siempre una única luz (que puede trombosarse). Es menos común que la proliferación microvascular, pero su asociación con gliomas de alto grado y peor pronóstico es mayor (fig.1.5.B).

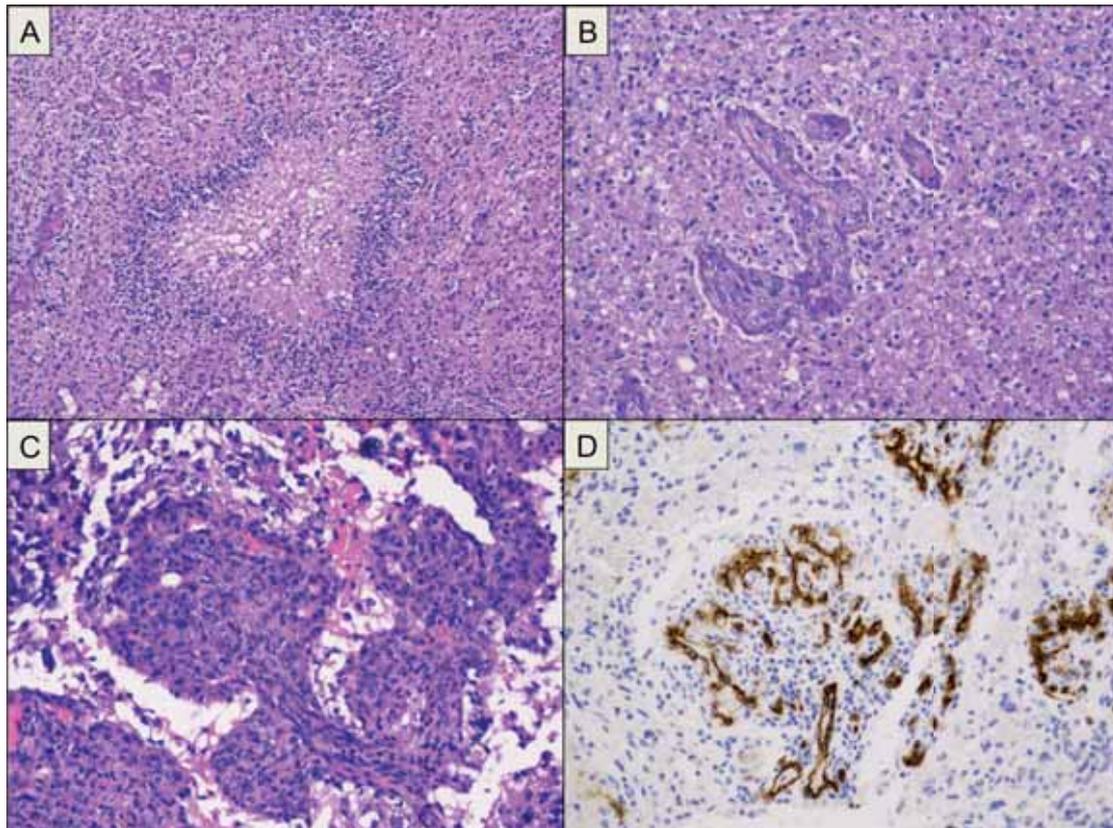


Figura 1.5. GBM, características histológicas: necrosis con pseudoempalizada (A: HE, 100x), hiperplasia endotelial (B: HE, 200x), proliferación microvascular (C: HE, D: CD34, 200x).

Podemos encontrar otros cambios vasculares en los GBM, como vasos telangiectásicos, engrosamiento colágeno de paredes vasculares, proliferaciones vasculares de tipo malformación vascular, que no constituyen criterios diagnósticos de glioblastoma.

En algunos casos la lesión muestra signos morfológicos claros de diferenciación astrocitaria, con grandes áreas de astrocitoma de menor grado y signos de alto grado. Aquí las células muestran extensa expresión de GFAP. En otros casos la lesión es más homogénea y está totalmente compuesta por células anaplásicas, incluso células gigantes multinucleadas, o células de pequeño tamaño con elevada relación núcleo:citoplasma, elevada densidad celular, ausencia de expresión de

GFAP y elevada actividad proliferativa. Este último tipo de GBM (“GBM de células pequeñas”) ha de ser diferenciado del oligodendroglioma anaplásico.

Actualmente se reconocen dos variantes histológicas de GBM: el de células gigantes (GBCG) y el gliosarcoma (GS). El GBCG representa alrededor del 5% de todos los GBM. Se caracteriza por la presencia de abundantes células gigantes multinucleadas bizarras (que pueden contener hasta más de 20 núcleos), y una rica trama de reticulina (fig. 1.6); molecularmente se caracterizan por una elevada frecuencia de mutaciones de *TP53*. Algunos estudios indican que el GBCG presenta un comportamiento algo mejor que el resto de GB, tal vez porque su crecimiento es menos infiltrante⁷⁻⁹. El GS representa alrededor del 2% de los GB. Muestra un patrón bifásico que alterna áreas gliales con áreas de diferenciación mesenquimal. Estas últimas carecen de expresión de proteína glial. Se ha sugerido que el GS podría tener mejor pronóstico que el GBM usual, pero no existen actualmente datos que lo corroboren³.

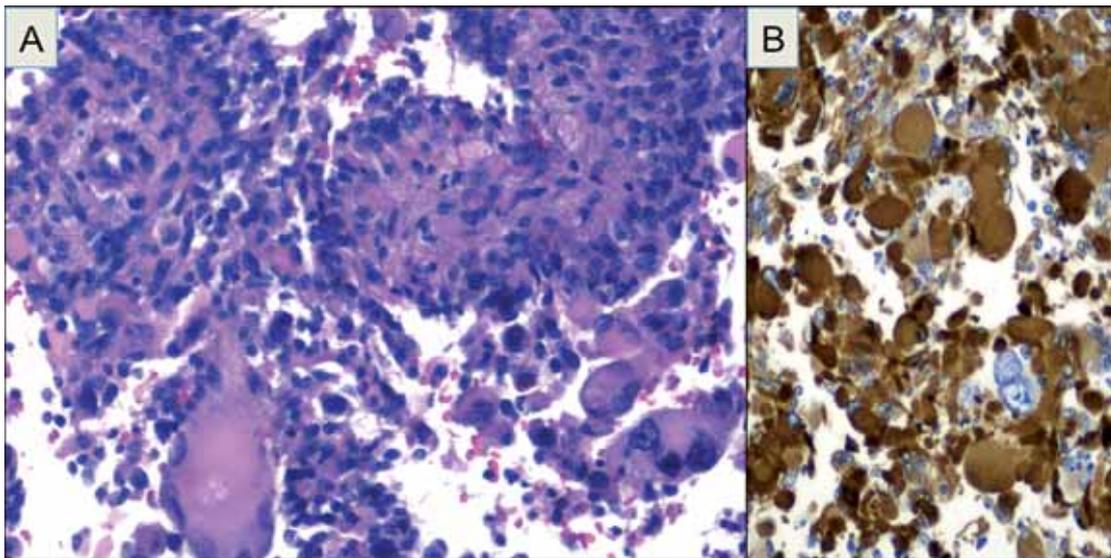


Figura 1.6. Glioblastoma de células gigantes, hematoxilina-eosina (A) y GFAP (B). 400x.

Las vías de diseminación que siguen las células del GBM para migrar son las denominadas *estructuras secundarias de Scherer*¹⁰. Las células se acumulan en la zona subpial, en la zona subependimaria, alrededor de las neuronas (satelitis perineuronal), y alrededor de los vasos, así como en las vías mielinizadas (donde las células pueden adoptar un aspecto polarizado, fusiforme). Estas estructuras secundarias no son exclusivas del GBM, sino que también pueden encontrarse en casos de gliomatosis cerebral y oligodendrogliomas. Suelen ser de gran utilidad para el diagnóstico de GBM en muestras pequeñas (biopsias estereotáxicas).

Glioblastomas primarios y secundarios

Los GBM pueden ser primarios (o de novo), o secundarios (a partir de un astrocitoma difuso de menor grado); esta diferencia fue descrita en 1940 por Scherer¹¹. Clásicamente, para realizar un diagnóstico de GBM secundario hacía falta una evidencia radiológica o histológica de una lesión de menor grado separada en el tiempo de la lesión de alto grado. Sin embargo, actualmente el conocimiento molecular de estos tumores permite establecer un diagnóstico de GBM secundario en base a un perfil de alteraciones moleculares. La pérdida de heterocigosidad del cromosoma 10 y la amplificación del gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*) son los eventos más frecuentes en GBM primarios (70% y 36% respectivamente)¹², mientras que la mutación del gen de la isocitrato deshidrogenasa (*IDH*) 1 o 2 lo es en GBM secundarios, presente en el 88% de los casos¹³ (ver figura 1.7 y apartado I.1.e). Los GBM primarios constituyen la gran mayoría de los GBM (más del 90%), el curso clínico es corto (normalmente menos de 3 meses) y afectan a pacientes mayores (edad media de 62 años). Los GBM secundarios suponen menos del 10% de los GBM, y afectan a pacientes jóvenes (edad media de 45 años). El tiempo de evolución desde la lesión de menor grado puede variar desde meses a más de 10 años (tiempo medio 4-5 años)¹⁴⁻¹⁶. La supervivencia media de estos pacientes es significativamente mayor que la de los pacientes con GBM primarios: 7,8 meses frente a 4,7 meses^{15,17}.

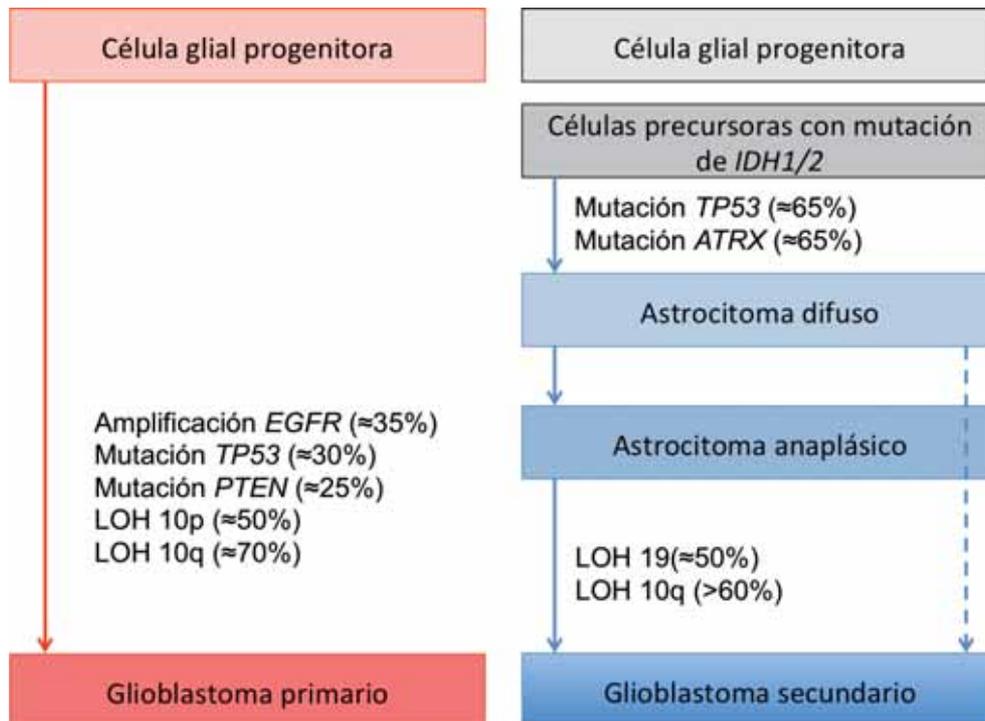


Figura 1.7. Vías genéticas de GBM primarios y secundarios. Modificado de Ohgaki y Kleuhes, 2013¹⁸.

1.1.b. Epidemiología de los astrocitomas infiltrantes difusos

En España, según datos de los registros poblacionales de cáncer que abarcan a un 25% aproximadamente de la población española, los tumores primarios del SNC representan un 2% del total del cáncer en el adulto y hasta casi un 15% en los niños menores de 15 años¹⁹.

Suponen la decimoprimer causa de muerte por cáncer en España según datos del año 2011²⁰ (fig. 1.8), con una mortalidad media ajustada por edad de 5,66/100000h entre los años 2003 y 2011 (4,89 en mujeres, 6,44 en hombres, fig. 1.9). Sin embargo su impacto social es muy elevado, ya que representan la cuarta causa de años potenciales de vida perdidos (APVP) por enfermedad neoplásica, después de los tumores de pulmón, mama y colon, a pesar de haber mejorado mucho en los últimos 30 años (94,33 APVP/100000h en 1980-1982 frente a 58,36 APVP en 2011). La incidencia es ligeramente mayor en hombres que en mujeres, con una edad media de presentación en la población española de 64,4 años (63 en hombres, 66,2 en mujeres).

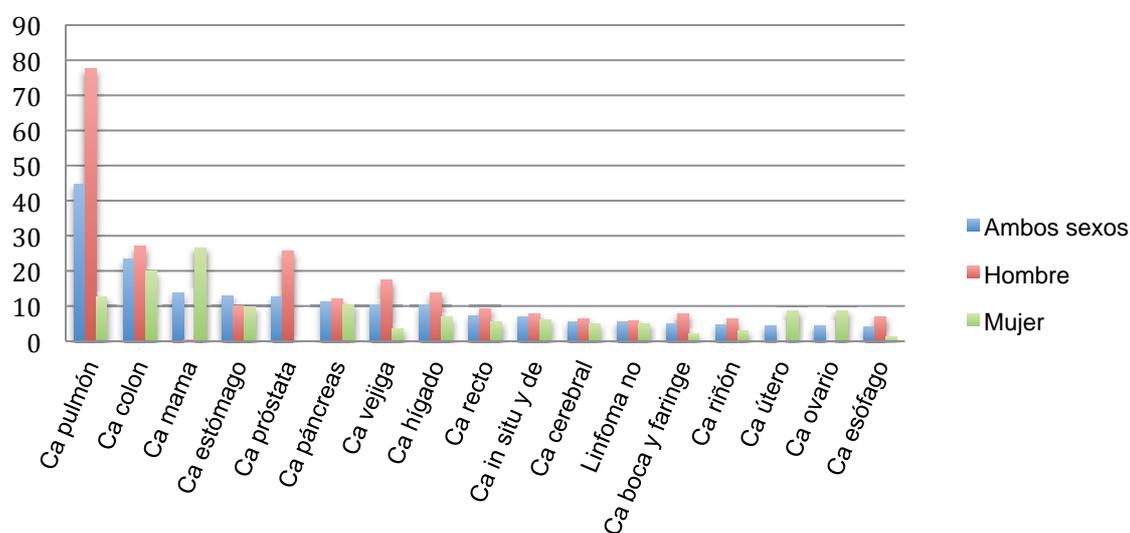


Figura 1.8. Mortalidad por cáncer en España (2003-2011). Tasa ajustada por edad por población europea por 100000h. Fuente: Centro Nacional de Epidemiología²⁰.

INTRODUCCIÓN

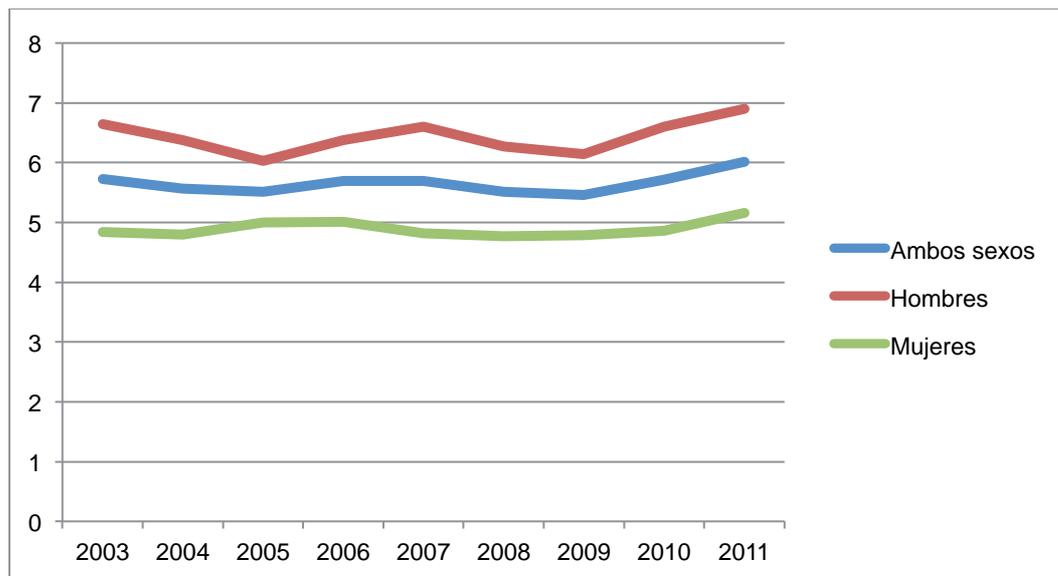


Figura 1.9. Mortalidad por tumores cerebrales en España (2003-2011). Tasa por 100000h. Fuente: Centro Nacional de Epidemiología²⁰

Datos geográficamente más cercanos a la población estudiada en este trabajo indican una incidencia de tumores cerebrales malignos en Girona y Tarragona de 8,7 (IC95%: 7,7-9,7) y 10,4 (9,2-11,7) casos por 100000 habitantes, respectivamente, y 1,4 (1,0-1,8) y 0,1 (0-0,3) casos de tumores cerebrales benignos por 100000 habitantes (datos del registro poblacional de cáncer de estas provincias). En cuanto al subtipo histológico de los tumores cerebrales, datos recogidos entre 1995 y 2002 en el registro europeo de cáncer²¹ describen un 23,8% de astrocitomas de bajo grado (incluyendo infiltrantes y bien delimitados, excepto astrocitomas pilocíticos), un 8,1% de astrocitomas anaplásicos y un 34,3% de glioblastomas en España (registros de Girona, Murcia, Navarra, Tarragona y País Vasco).

1.1.c. Presentación clínica y radiológica de los astrocitomas infiltrantes difusos

Como cualquier lesión intracraneal expansiva, los AID pueden producir signos y síntomas inespecíficos, como aumento de la presión intracraneal, convulsiones y déficits neurológicos en función de la localización de la lesión y de su velocidad de crecimiento.

Cuando afectan a hemisferios cerebrales, los astrocitomas difusos, grado II, presentan con mayor frecuencia convulsiones, y con menor frecuencia déficits neurológicos que los tumores de alto grado⁴ (sólo un tercio de los GBM presentan convulsiones). Al interrogar al paciente pueden detectarse retrospectivamente alteraciones sutiles como dificultades en el habla, cambios en la sensibilidad, visión

o pequeñas alteraciones motrices³. Si la lesión afecta el lóbulo frontal, el paciente puede presentar cambios de comportamiento o de personalidad. Los síntomas en un caso de GBM, aunque similares a los de astrocitomas de menor grado, suelen ser de presentación más abrupta y estar relacionados con el edema y aumento de la presión intracraneal que producen: cefaleas, náuseas y vómitos, papiledema. En algunos casos la sintomatología se ve agravada y acelerada por una hemorragia tumoral aguda. Un caso singular es el GBM secundario, en el que el curso clínico es más largo y empezará como astrocitoma de menor grado, con síntomas más larvados.

Cuando se localizan en el troncoencéfalo los AID pueden producir signos neurológicos por infiltración de núcleos de pares craneales y compresión de los tractos sensitivo-motores que atraviesan protuberancia y bulbo.

Radiológicamente el AD suele presentarse, en la tomografía computerizada (TC), como una masa homogénea mal definida, isodensa o hipodensa, sin realce tras administración de contraste. Sin embargo pueden encontrarse calcificaciones y cambios quísticos. En la resonancia magnética (RM) suele mostrar hipointensidad en secuencias ponderadas T1 e hiperintensidad en secuencias ponderadas T2, la lesión suele estar localizada en sustancia blanca, expandiendo la corteza suprayacente (fig. 1.10). Es poco frecuente encontrar un realce con gadolinio en los astrocitomas de bajo grado, pero suele encontrarse cuando progresan a AA. El estudio de perfusión no muestra aumento del volumen cerebral en estas lesiones²² (fig. 1.11).

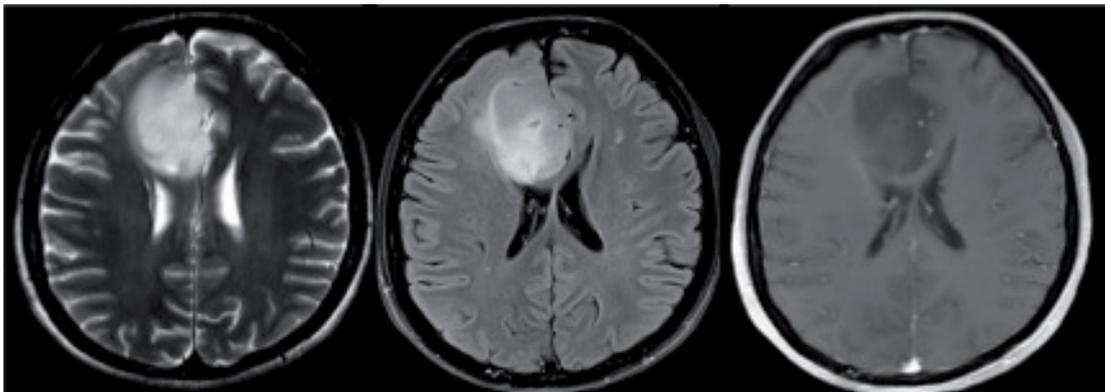


Figura 1.10. RM craneal mediante secuencias ponderadas en T2 , FLAIR y T1 tras la administración de contraste intravenoso, en paciente con glioma de bajo grado, que muestra la presencia de una tumoración de características infiltrativo-expansivas y localización córtico-subcortical frontal parasagital derecha. Nótese como dicha tumoración que muestra una señal de resonancia predominantemente hiperintensa en las secuencias T2, no se realza tras la administración de contraste

INTRODUCCIÓN

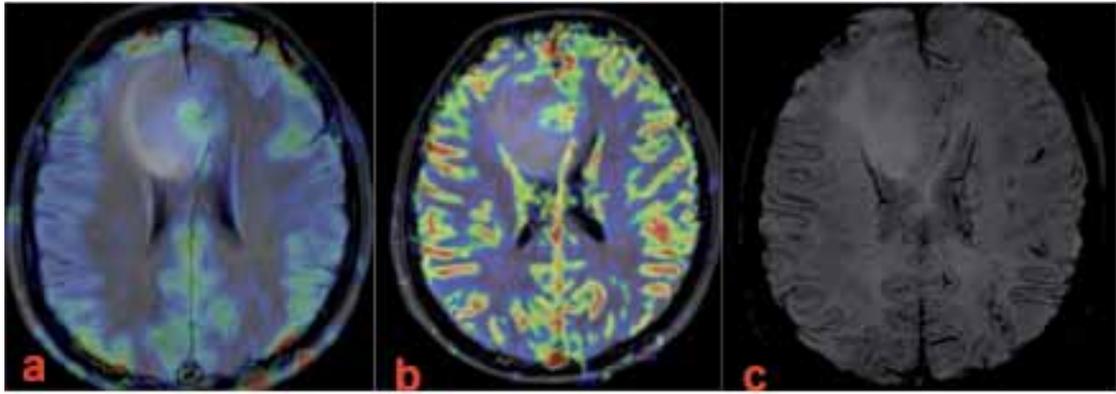


Figura 1.11. RM craneal de perfusión mediante técnica ASL (a) y tras primer paso de contraste (b), que no muestran aumento del flujo o volumen sanguíneo cerebrales en el seno de la tumoración. La secuencia de susceptibilidad magnética (c) tampoco pone de manifiesto señal de susceptibilidad intralesional que indique la presencia de vasos aberrantes/neoformados en el lecho tumoral.

El astrocitoma anaplásico aparece en la TC como una lesión hipodensa, más heterogénea que el AD, con efecto masa. En la RM es también heterogéneo, es hipointenso en T1 e hiperintenso en T2 (fig. 1.12). El realce tras contraste que puede observarse nunca será en anillo (ver GBM más adelante). El estudio de perfusión muestra un volumen sanguíneo aumentado²² (fig. 1.13).

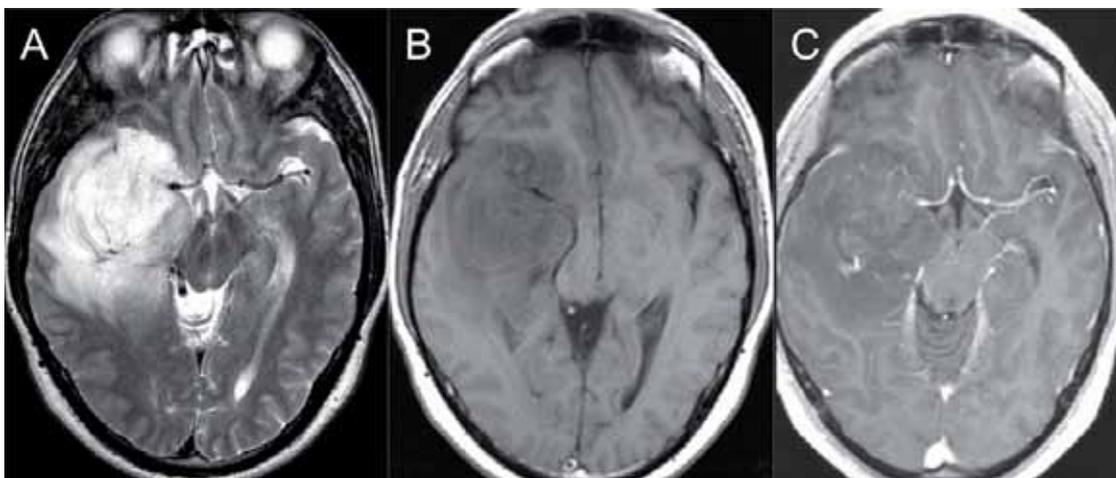


Figura 1.12. Secuencias T2 (A) y T1 pre y post contraste (B y C). Extensa lesión infiltrativa-expansiva temporal izquierda con efecto de masa sobre tronco encefálico. En T1 postcontraste se observa como engloba arteria cerebral media no evidenciando claros realces.

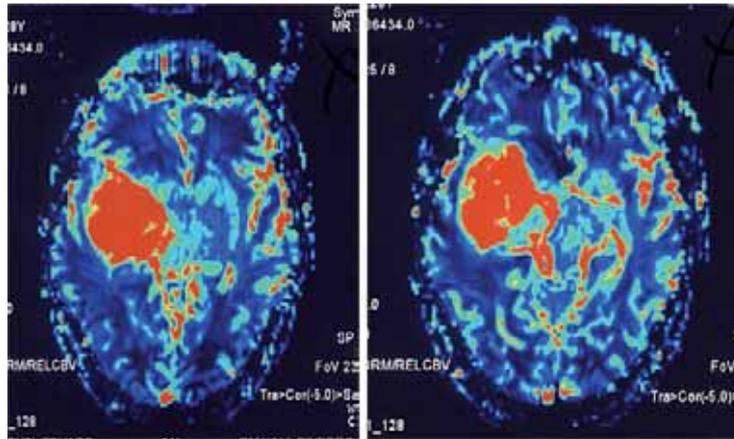


Figura 1.13. Estudio de perfusión tras contraste que evidencia un claro aumento del volumen sanguíneo cerebral de la lesión.

Los GBM aparecen, en la TC, como grandes lesiones con importante efecto masa y centro hipodenso, con edema vasogénico. Los márgenes de la lesión, gruesos e irregulares, suelen presentar realce heterogéneo intenso. En la RM los GBM presentan un anillo de realce en las secuencias T1 postcontraste, y una amplia zona de edema alrededor que se observa en T2 y FLAIR (fig. 1.14). La zona hipointensa central de las lesiones corresponde a un centro necrótico, mientras que el anillo de realce corresponde a tejido tumoral altamente celular con vasos anómalos por los que circula el contraste (fig. 1.15). La zona periférica atenuada corresponde a edema vasogénico con células tumorales aisladas que van infiltrando el tejido^{23,24}. No suelen observarse quistes en GBM no tratados (de hecho, la presencia de áreas quísticas de gran tamaño debería replantear el diagnóstico de GB).

INTRODUCCIÓN

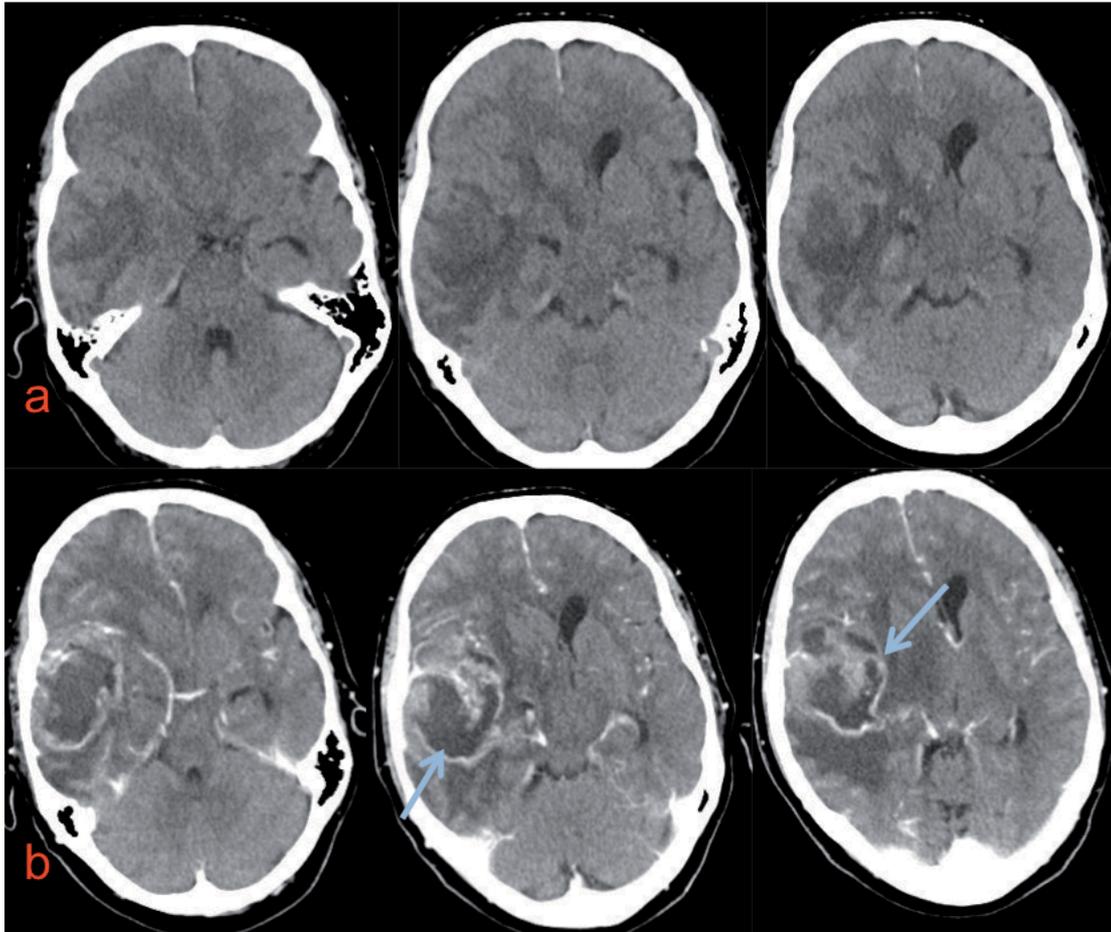


Figura 1.14. Glioblastoma frontotemporal derecho. TC craneal simple (a) y tras administración de contraste intravenoso (b), muestra la presencia de una voluminosa tumoración intraparenquimatosa de localización frontotemporal derecha que se circunda de edema vasogénico y condiciona en su efecto de masa una compresión del sistema ventricular y desviación contralateral de estructuras de línea media. Las imágenes tras la administración de contraste muestran un realce predominantemente marginal (flechas), que bordea un centro de aspecto necrótico.

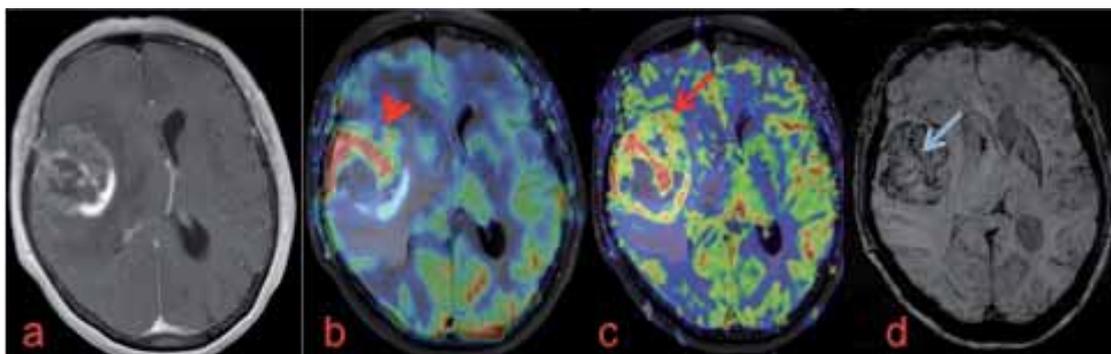


Figura 1.15. Estudio de RM mediante secuencias T1 con gadolinio (a), estudio de perfusión mediante técnica ASL (b), perfusión tras primer paso de contraste (c) y susceptibilidad magnética (d), que constatan un realce heterogéneo y predominantemente marginal de la lesión, así como un aumento del flujo (cabeza de flecha) y volumen sanguíneo cerebrales (flecha roja) y presencia de estructuras vasculares aberrantes y neoformadas (flecha azul).

1.1.d. Comportamiento biológico de los astrocitomas infiltrantes difusos

Los astrocitomas infiltrantes difusos son tumores que progresan inevitablemente, aumentando tanto el tamaño tumoral como el grado histológico. En la clasificación actual de la OMS a los AD se les otorga un grado II de malignidad, siendo por lo tanto tumores de bajo grado, pero progresarán con mayor o menor velocidad a una neoplasia de mayor grado. La progresión a GBM en astrocitomas difusos se da a los 4-5 años del diagnóstico, y en una media de 2 años en astrocitomas anaplásicos³.

Los estudios centrados en la zona del sur de Europa (España, Italia, Malta, Eslovenia y Portugal) reflejan una supervivencia del 42,6% a los 5 años en AD (IC95%: 33,9-51,1), del 18,1% en AA (11,8-25,4) y del 2,8% en GBM (1,8-4,3)²¹. Datos más cercanos, de la población de Girona entre 1994 y 2005, reflejan una supervivencia a los 5 años del 14,6% en tumores astrocitarios (no sólo AID). Por tipo histológico, este mismo estudio encuentra una supervivencia a los 5 años del 38,4% en astrocitomas difusos, del 14,5% en astrocitomas anaplásicos y del 5,2% en GBM²⁵ (fig. 1. 16).

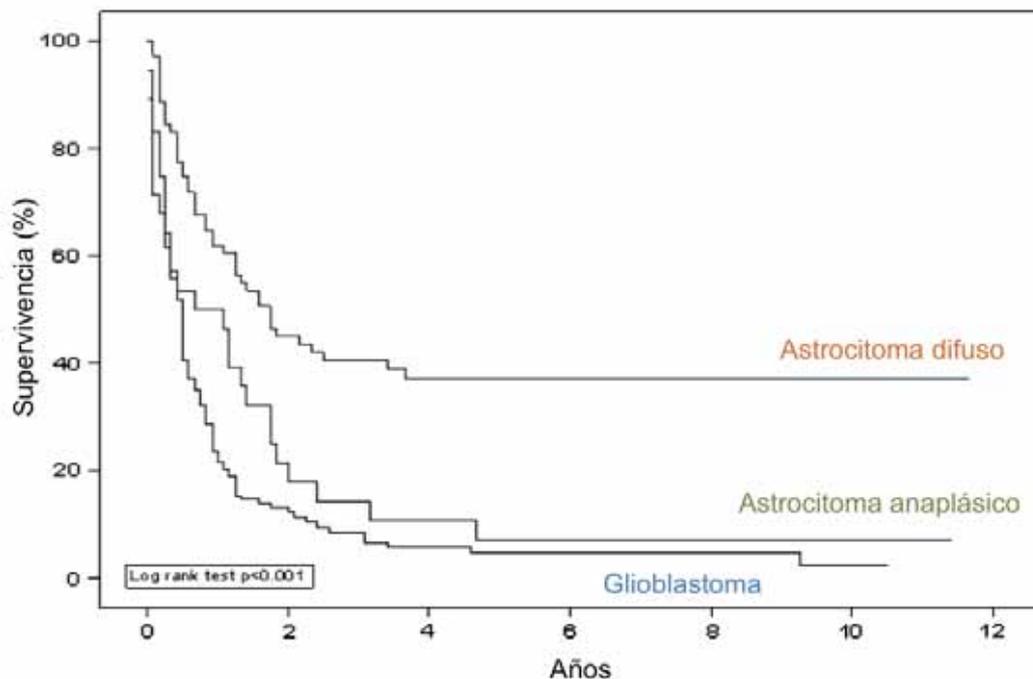


Figura 1.16. Supervivencia de AID en función del tipo histológico (Girona, 1994-2005). Modificado de Fuentes-Raspall et al, 2011²⁵.

INTRODUCCIÓN

1.1.e. Alteraciones moleculares en astrocitomas infiltrantes difusos

i. Vía de TP53/MDM2/p14^{ARF}

TP53 (gen localizado en 17p13.1) codifica la proteína p53, involucrada en varios procesos celulares, como regulación del ciclo celular, respuesta de las células a daños del ADN, diferenciación y muerte celular²⁶. La actividad de esta proteína está regulada por MDM4 y MDM2, que a su vez está modulado²⁷ por p14^{ARF}. Entre el 60 y 80% de los astrocitomas difusos tienen pérdidas alélicas en el brazo pequeño del cromosoma 17 que incluyen el locus del gen *TP53*^{16,28-31}, y la mayoría de los AD que conservan el locus presentan mutaciones de *TP53*^{28,32-34}, por lo que la ausencia de forma salvaje de p53 es el evento genómico más importante en AD. Estas cifras aumentan cuando nos referimos a los astrocitomas gemistocíticos, en los que más del 80% presentan alteraciones de *TP53*^{29,30}. Tanto los astrocitomas anaplásicos, que corresponden a una etapa intermedia en la evolución de los astrocitomas difusos hacia glioblastomas, como los glioblastomas secundarios, presentan mutaciones de *TP53* y pérdidas de heterocigosidad del cromosoma 17 con unas tasas similares a los difusos^{17,30,35}. También se han descrito alteraciones de *TP53* en GBM primarios pero, mientras que en los GBM secundarios el 57% de las mutaciones están localizadas en dos codones “calientes” (248 y 273), en los primarios las alteraciones del gen se distribuyen de manera más igualada entre todos los codones¹².

ii. PDGFR:

El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) es un potente mitógeno para células de tejido conectivo y glía, con un papel importante en procesos fisiológicos como el desarrollo embrionario normal, la diferenciación celular y la respuesta a daño tisular, pero también en la cicatrización, inflamación y neoplasias^{36,37}. Este factor es reconocido por dos tipos de receptores tirosín-kinasa de membrana, PDGFRB y PDGFRA. La unión de su ligando activa una vía de transmisión de señal oncogénica como MAPK, PI3K/AKT, JAK/STAT y PLC/PKC³⁸. Hasta un 16% de los astrocitomas difusos presentan ganancias de *PDGFRA*, aunque los resultados de la literatura respecto a su efecto en la supervivencia del paciente son controvertidos^{36,39,40}.

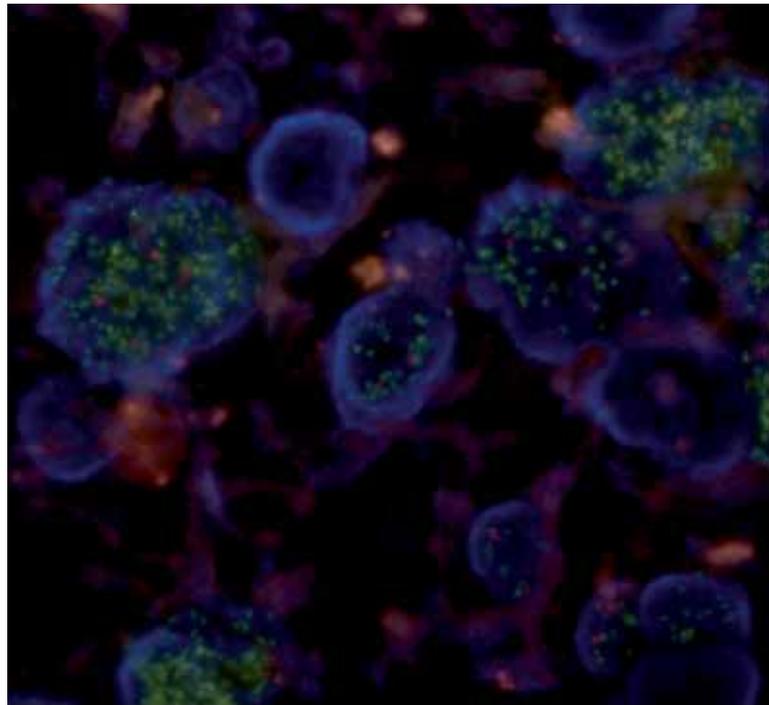
iii. EGFR:

El gen *EGFR*, situado en el cromosoma 7, codifica un receptor transmembrana, EGFR o HER1, que se activa por la unión de sus ligandos extracelulares, EGF

(factor de crecimiento epidérmico) o TGF- α (factor de crecimiento tumoral), y transmite la señal proliferativa⁴¹. Este gen es el que se amplifica con mayor frecuencia en glioblastomas^{3,42}, hasta en el 36% de los glioblastomas primarios¹⁷, aunque es poco frecuente en los secundarios^{17,30,43} (8%). De la misma manera, la sobreexpresión de la proteína EGFR es mucho más frecuente en GBM primarios (>60%) que en secundarios (<10%)^{12,43}. Existe una estrecha relación entre la amplificación del gen y la sobreexpresión de la proteína: todos los tumores con amplificación de *EGFR* presentan sobreexpresión de EGFR, mientras que el 70-90% de los que presentan sobreexpresión de EGFR tienen amplificación de *EGFR*⁴⁴. El valor predictivo de la mutación de *EGFR* es controvertido⁴⁵; algunos estudios lo relacionan con peor pronóstico^{46,47}, principalmente en pacientes menores de 60 años⁴⁸, o en pacientes de edad menor a la media⁴⁹. Otros estudios no encuentran relación entre el estado de *EGFR* y la supervivencia^{17,50,51}, y otros muestra que la amplificación del gen es un predictor de mayor supervivencia en pacientes mayores^{52,53}.

Se han identificado varias formas mutadas de EGFR; la más frecuente en GBM es la EGFRvIII. Ésta se caracteriza por la delección en el dominio extracelular de 267 aminoácidos, que imposibilita la unión del ligando pero provoca una activación constitutiva del receptor⁵⁴, activando las vías de proliferación celular. Esta mutación se encuentra en el 20-50% de los GBM con amplificación de *EGFR*^{44,55,56}.

Figura 1.17. Estudio por hibridación in situ con fluorescencia (FISH) del gen *EGFR* de un caso de GBM con amplificación (aumento del número de señales verdes, representando al locus del gen *EGFR*, respecto al número de señales rojas, que representan el centrómero del cromosoma 7).



INTRODUCCIÓN

iv. Vía de *PI3K/PTEN/AKT*:

La vía de *PI3K/PTEN/AKT* es una vía de señalización intracelular: la activación de receptores de factores de crecimiento provoca la incorporación de PI3K (fosfatidilinositol-3-quinasa) a la membrana celular. Éste convierte PIP2 (fosfatidilinositol-4,5-bifosfato) a PIP3, que activa moléculas efectoras posteriores, como AKT o mTOR (diana de rapamicina en células de mamífero, mammalian Target of Rapamycin), activando la proliferación y supervivencia celular³.

El gen de *PTEN* (homólogo de tensina y fosfatasa, *phosphatase and tensin homolog*), localizado en el brazo largo del cromosoma 10 (10q23.3), es un gen supresor tumoral que codifica una proteína que tiene un dominio central homólogo a la región catalítica de las proteínas tirosín-fosfatasas⁵⁷⁻⁵⁹. Esta proteína inhibe la función de PIP3^{3,60}, bloqueando así la proliferación celular. La mutación de *PTEN* se encuentra en un 20-40% de los GBM^{61,62} primarios, pero es muy rara en los secundarios^{17,63} y en astrocitomas de menor grado.

El gen que codifica la subunidad catalítica de PI3K p110alfa, *PIK3CA*, se encuentra alterado, ya sea por mutaciones o amplificaciones, en una gran variedad de neoplasias^{64,65} (hígado, mama, colon, ovario, estómago, pulmón). Un único estudio describe mutaciones de *PIK3CA* en el 27% de los glioblastomas⁶⁵, pero en general se encuentran con baja frecuencia (5-7%)⁶⁶⁻⁶⁹, tanto en GBM primarios (5%) como secundarios (3%)⁷⁰. La amplificación del gen parece ser un evento algo más frecuente, encontrado en el 12% de GBM primarios y en el 9% de los secundarios. No se encuentran mutaciones de *PIK3CA* en astrocitomas de bajo grado, y en muy baja frecuencia en astrocitomas anaplásicos, ni amplificaciones en AD y AA.

En general el 63% de los GBM primarios muestran alteraciones en genes de la vía *EGFR/PTEN/PIK3CA*, mientras que sólo el 31% de los secundarios lo hacen.

v. Vía de *p16^{INK4a}/CDK4/RB1*

P16 es una proteína supresora tumoral codificada por el gen *CDKN2A* (inhibidor de kinasas dependientes de ciclina 2A, localizado en 9p21.3). Es capaz de regular el ciclo celular al frenar la progresión de la fase G1 a la S; para ello inhibe kinasas dependientes de ciclo (CDK) como CDK4, que en condiciones normales fosforilan la proteína de retinoblastoma RB1. Esto provoca la liberación del factor de transcripción E2F, que activa genes involucrados en la transición de G1 a S⁷¹. Por lo tanto alteraciones en los componentes de esta vía provocarán una pérdida de control del ciclo celular. Alrededor del 10% de los astrocitomas anaplásicos presentan amplificación y sobreexpresión del gen *CDK4*⁷², principalmente los tumores que no tienen mutaciones o deleciones de *CDKN2A*⁷³⁻⁷⁵, y un 25% de los

AA muestran mutaciones en el gen *RB1*⁷³. Los glioblastomas primarios presentan deleciones de *p16*^{INK4a} con mayor frecuencia que los secundarios (36% frente a 4%)⁷⁶, sin diferencias significativas en cuanto a la frecuencia global de alteraciones de *p16* (deleción homocigota y metilación del promotor)^{12,76,77}. En los GBM secundarios la metilación del gen *RB1* (43%) es significativamente más frecuente que en primarios (14%), con una correlación significativa entre la metilación del promotor del gen y la pérdida de expresión de la proteína RB1⁷⁸.

vi. Pérdida de heterocigosidad del cromosoma 10 (LOH 10)

La pérdida de heterocigosidad del cromosoma 10 es el evento genético más frecuente en glioblastoma, dándose en primarios y secundarios en frecuencias similares (60-80%)^{17,79-82}, con una deleción común en 10q25-qter. Esta alteración se asocia histológicamente con transición de AD o AA a fenotipo de GB⁷⁹. La afectación del brazo corto del cromosoma 10 es en cambio exclusiva de los GBM primarios⁷⁹, y la pérdida completa del cromosoma 10 es también típica de los primarios. En astrocitomas de bajo grado, la afectación del cromosoma 10 es infrecuente. La frecuencia de mutaciones en *PTEN* (20-40%) no coincide con la frecuencia de pérdida de heterocigosidad de la región cromosómica que contiene este gen (75-95), por lo que se postula que existen genes supresores tumorales en 10q aún no identificados^{3,12}.

vii. O⁶-metilguanin-DNA metiltransferasa

El gen *MGMT* (O⁶-metilguanin-DNA metiltransferasa), localizado en el brazo largo del cromosoma 10 (10q26) se encuentra silenciado con frecuencia en gliomas, por metilación de su promotor^{74,83} (hasta en un 40% de los glioblastomas primarios). Este gen codifica una proteína reparadora del ADN que elimina grupos alquiles de la posición O⁶ de la guanina, un sitio importante en la alquilación de ADN⁸⁴. Niveles elevados de esta proteína dificultan por lo tanto la acción alquilante de agentes terapéuticos, provocando un fallo del tratamiento. La silenciación epigenética de *MGMT* por hipermetilación de su promotor es el mecanismo principal de reducción de expresión de *MGMT*, y se ha asociado con glioblastomas que responden a quimioterapias alquilantes, utilizando nitrosureas⁸⁵, temozolamida⁸⁶ o ambas⁸⁷ (fig. 1.19). Ensayos clínicos comparando pacientes con metilación del promotor de *MGMT*, con los que no la tenían, encontraron una supervivencia significativamente mayor en el primer grupo tras tratamiento con quimio y radioterapia⁸⁶. Esto no ocurría si el tratamiento era simplemente radioterapia, por lo que la metilación del *MGMT* es un factor predictivo de respuesta a la quimioterapia.

INTRODUCCIÓN

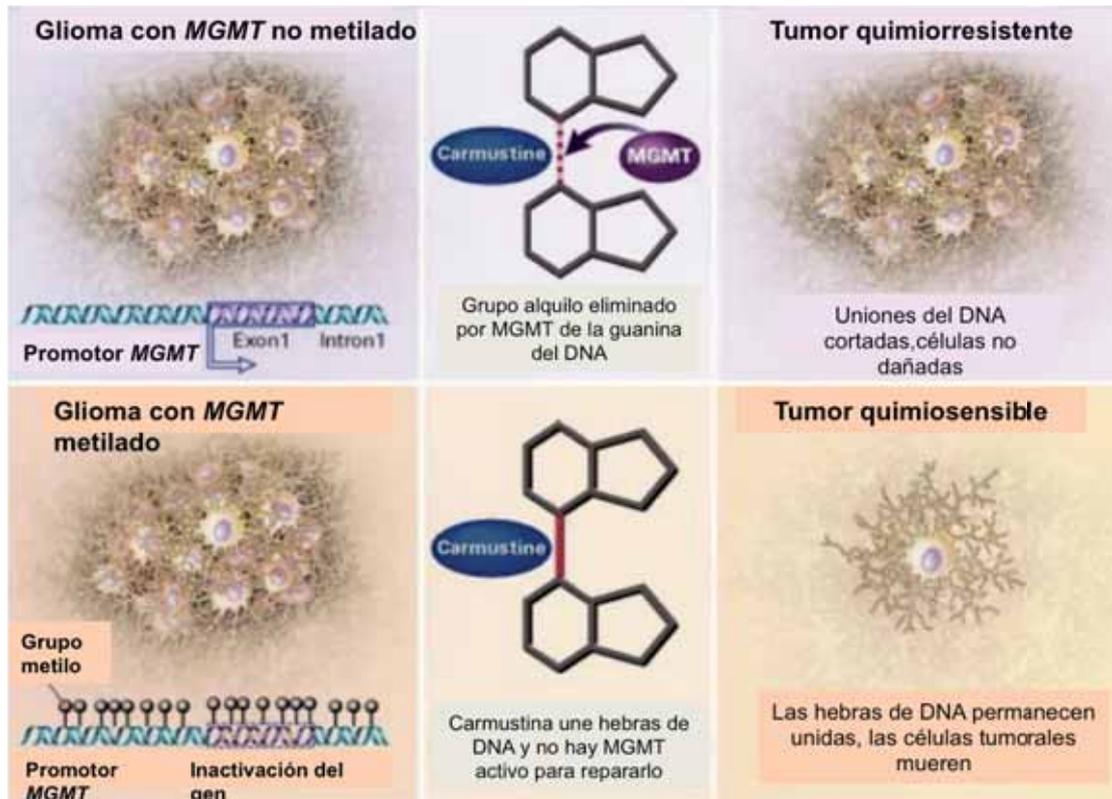


Figura 1.19. Mecanismo de quimiosensibilidad aumentada por inactivación epigenética del gen reparador *MGMT*. Los gliomas con promotor de *MGMT* metilado y región del exón 1 metilado muestran silenciamiento transcripcional de *MGMT*, llevando a la pérdida de la proteína *MGMT*. Los aductos de DNA producidos por la carmustina en estos tumores no se eliminan eficazmente, llevando a la muerte de células tumorales y toxicidad del fármaco. En cambio, los gliomas con promotor de *MGMT* y exón 1 no metilados expresan la proteína *MGMT*, que elimina los aductos de guanina del DNA (producidos por la administración de carmustina, BCNU, llevando a la resistencia a los efectos tumorocidas y tóxicos del fármaco)⁸⁵.

viii. Isocitrato Deshidrogenasa:

El gen de la isocitrato deshidrogenasa 1, *IDH1*, localizado en el cromosoma 2q33, codifica una enzima importante en el ciclo del ácido cítrico, que cataliza el paso de isocitrato a alfa-ketoglutarato, produciendo NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato)⁸⁸. Un estudio genómico exhaustivo de GBM mostró mutaciones de este gen en un 12% de los casos⁸⁹, afectando principalmente a los GBM secundarios frente a los primarios (88% frente a 7%)¹³. La alteración encontrada en la mayoría de los casos es una mutación somática en el codón 132 del gen *IDH1* que cambia arginina por histidina (R132H)¹³. Se ha encontrado esta mutación en astrocitomas difusos (79%) y anaplásicos (62%), así como en oligodendrogliomas de grados II y III y oligoastrocitomas II y III. El hallazgo de esta mutación en GBM es un marcador de mejor pronóstico, y signo definitivo de GBM secundario¹⁸. Esto ha cambiado por completo el enfoque de los GBM primarios y secundarios, para los que hasta ahora no había diagnóstico definitivo puesto que sus alteraciones

moleculares, aunque distintas en porcentajes, se superponen con frecuencia. Con la detección de la mutación de *IDH1* es posible diagnosticar un GBM secundario sin historia previa de lesión, radiológica o histológicamente. Actualmente existe un anticuerpo específico de esta mutación, que permite detectarla de manera rápida y asequible en cualquier laboratorio (las células que expresan el anticuerpo muestran la mutación)⁹⁰.

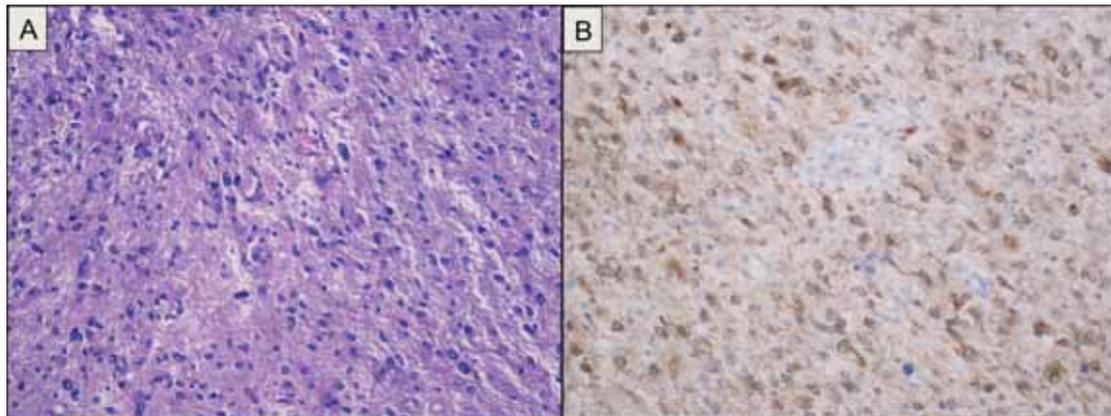


Figura 1.20. Astrocitoma anaplásico con mutación de *IDH1* R132H. A. Hematoxina-eosina, 200x. B. Estudio inmunohistoquímico de la mutación de *IDH1* R132H. Muestran expresión de la proteína mutada, nuclear y citoplasmática, las células tumorales, y quedan sin teñir las células endoteliales, células inflamatorias y células no neoplásicas.

Además de su alteración en gliomas, *IDH* se encuentra mutado en otros tipos tumorales: leucemia mieloide aguda (10-30%), linfoma de células T angioinmunoblástico (10-40%), condrosarcoma (50-70%), colangiocarcinoma intrahepático (10-20%) y carcinoma de próstata (2%)^{91,92}. En condrosarcomas, colangiocarcinomas y carcinomas prostáticos predominan las mutación de *IDH1*, y en leucemias y linfomas T las de *IDH2*. En colangiocarcinomas, como en gliomas, la presencia de mutaciones de *IDH* parece indicar mejor supervivencia global. En neoplasias hematológicas los resultados son ambiguos, con estudios que no demuestran impacto en el pronóstico de la enfermedad y otros que describen un aumento o disminución del riesgo de recaída⁹².

ix. *ATRX*

El gen de *ATRX* (síndrome de alfa-talasemia y retraso mental ligado al X) codifica una proteína implicada en una vía de remodelación de cromatina. En 2011 se describieron mutaciones de *ATRX* en tumores cerebrales por primera vez⁹³. Las alteraciones en *ATRX* se encuentran principalmente en tumores de estirpe astrocitaria y son específicas de astrocitomas con mutación de *IDH1* o 2 y *TP53*⁹⁴. Se han descrito mutaciones de *ATRX* en 71% de astrocitomas difusos y

INTRODUCCIÓN

anaplásicos, y en 68% de los tumores mixtos oligoastrocitarios. Son más frecuentes en GBM secundarios (57%) que en primarios (4%)⁹⁴. La baja frecuencia de estas mutaciones en tumores oligodendrogliales puros (14%) hace de la mutación de *ATRX* una herramienta de peso para diferenciar entre oligodendrogliomas y astrocitomas en caso de duda y se perfila como clave en futuros algoritmos diagnósticos. De esta manera, las guías de Haarlem de la Sociedad Internacional de Neuropatología⁹⁵ proponen redirigir el diagnóstico de oligoastrocitoma hacia oligodendroglioma o astrocitoma, si el perfil de IDH/delección de 1p-19q/*ATRX* lo permite (morfología mixta con mutación de IDH-codelección de 1p/19q-ausencia de mutación de *ATRX* decantaría el diagnóstico hacia oligodendroglioma, morfología mixta con mutación de IDH-ausencia de codelección de 1p/19q-mutación de *ATRX* decantaría el diagnóstico hacia astrocitoma). Además de esta ayuda al diagnóstico, la pérdida de *ATRX* tiene valor pronóstico: los astrocitomas con mutación de IDH y mutación de *ATRX* tienen un pronóstico significativamente mejor que el grupo con mutación de IDH, sin mutación de *ATRX*.

La pérdida de expresión nuclear de la proteína *ATRX* parece ser un buen sustituto de la determinación de mutaciones de *ATRX*⁹³, y puede detectarse mediante estudio inmunohistoquímico con un anticuerpo disponible comercialmente. La proteína *ATRX* se expresa de manera ubicua en núcleos celulares. Las mutaciones en el gen causan la pérdida de esta expresión, de manera que en el estudio inmunohistoquímico encontraremos ausencia de expresión de *ATRX* en las células tumorales con la mutación, con expresión preservada en células endoteliales, celularidad inflamatoria y células no tumorales del parénquima cerebral infiltrado.

1.1.f. Clasificación molecular basada en perfiles de expresión génica: subtipos de GBM proneural, neural, clásico y mesenquimal.

La Red de Investigación del Atlas Genómico Humano (The Cancer Genome Atlas, TCGA) se creó con el fin de generar un catálogo de anomalías genómicas generadoras de tumores. En 2008 publicaron los resultados del estudio de glioblastomas, el primer tipo de cáncer que analizaron⁹⁶. Estudiaron en ese momento una gran cohorte de 206 GB, realizando un análisis integral del número de copias de ADN, de la expresión génica y de las aberraciones en la metilación, así como aberraciones en la secuencia de nucleótidos en 91 de los 206 casos. Confirmaron mutaciones en *RB1* y *TP53* previamente descritas, e identificaron mutaciones asociadas a GBM en genes como *PIK3R1*, *NF1* y *ERBB2*. Verhaak y

cols se basaron en los resultados del TCGA para definir cuatro subtipos moleculares de GB: clásico, mesenquimal, proneural y neural⁹⁷.

i. GB clásico

Los **GBM clásicos** muestran amplificación de cromosoma 7 (*EGFR*) y pérdida del cromosoma 10. Junto con alteraciones muy frecuentes de *EGFR*, presentan delección focal homocigota de 9p21.3 (afectando a *CDKN2A*, que codifica *p16INK4A* y *p14ARF*) y ausencia de mutaciones de *TP53* (a pesar de ser éste el gen mutado con mayor frecuencia en los GBM). La delección homocigota de 9p21.3 es casi mutuamente excluyente con alteraciones de otros componentes de la vía RB (*RB1*, *CDK4* y *CCDN2*), por lo que probablemente las muestras con amplificación de *EGFR* presentan una activación de la vía RB a través de la delección de *CDKN2A* de manera casi exclusiva. Los GBM clásicos presentan también un aumento de expresión de otras vías de señalización, como las de *NES*, Notch y Sonic hedgehog¹⁸.

ii. GB mesenquimal

La alteración molecular predominante en el subtipo **mesenquimal** es la delección focal hemizigota de 17q11.2, que contiene el gen *NF1*, con niveles bajos de expresión en la mayoría de las muestras. No se encontró metilación en las zonas adyacentes al locus de *NF1*, aunque sí mutaciones (70% clasificadas como mesenquimales) y otras alteraciones de *NF1* en el 53% de los casos. Estos tumores presentan niveles elevados de marcadores mesenquimales, junto con marcadores astrocitarios, lo que sugiere una transición epitelio-mesénquima que se ha relacionado con tumores desdiferenciados y transdiferenciados⁹⁸. También se encuentran sobreexpresados en este subtipo genes de la superfamilia de los factores de necrosis tumoral y de la vía *NF-kB*, potencialmente como consecuencia de la abundante necrosis y de los infiltrados inflamatorios asociados.

iii. GB proneural

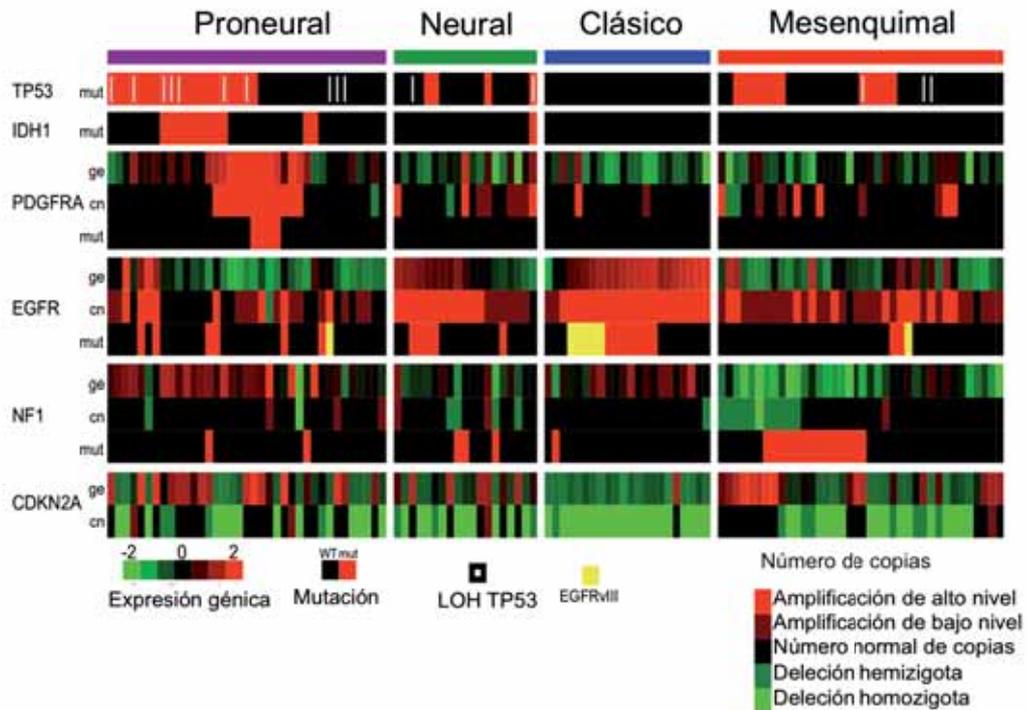
Los GBM del subtipo **proneural** presentan dos grandes características: alteraciones de *PDGFRA* y mutaciones puntuales de *IDH1*. En todos los subtipos de GBM se encuentran amplificaciones focales del locus 4q12 que contiene *PDGFRA*, pero con una tasa mucho mayor en el subtipo proneural. La amplificación focal concomitante junto con niveles elevados de expresión del gen *PDGFRA* son la firma característica de este subtipo de GBM.

INTRODUCCIÓN

El 92% de los casos del TCGA con mutación del gen de la isocitrato deshidrogenasa 1 (*IDH1*) pertenecen al subtipo proneural, la mayoría sin alteración del *PDGFRA*. Otro evento frecuente en este subtipo es la mutación y pérdida de heterocigosidad de *TP53*. De hecho, considerando la totalidad de casos estudiados, los GBM proneurales son los que muestran estas alteraciones con mayor frecuencia. En cambio, la amplificación del cromosoma 7 asociada con pérdida del 10 (evento clásico del GBM) es claramente menos frecuente en este subtipo (54%). Los GBM secundarios muestran un perfil de expresión génica correspondiente al subtipo proneural.

iv. GB neural

La expresión de marcadores neuronales es lo que caracteriza el subtipo **neural** (*NEFL*, *GABRA1*, *SYT1* y *SLC12A5*). Las categorías génicas asociadas con el subtipo neural incluyen proyecciones neuronales y axones y transmisiones sinápticas. De hecho, dos muestras de tejido cerebral normal fueron clasificadas como subtipo neural.



v. Semejanza con estirpes celulares gliales o neuronales

Comparando los perfiles de expresión génica de los cuatro subtipos con las firmas de expresión génica de oligodendrocitos, neuronas, astrocitos y astrogliá cultivada (generadas a partir de modelos murinos), se hallaron semejanzas entre el subtipo proneural y los oligodendrocitos. El subtipo clásico se asoció con la firma astrocitaria, el neural con oligodendrocitos y astrocitos pero principalmente con neuronas. El subtipo mesenquimal mostró una fuerte asociación con la astrogliá cultivada y con la mayoría de líneas celulares inmortalizadas.

vi. Subtipos y correlación clínica y pronóstica

De las variables estudiadas (edad, sexo, supervivencia, puntuación de Karnofsky), sólo se encontraron diferencias en la edad de los pacientes. El grupo de GBM proneurales presentaba una edad media más joven.

INTRODUCCIÓN

Comparando el efecto de un tratamiento intensivo (quimio y radioterapia simultáneas, o más de 3 ciclos consecutivos de quimioterapia) con regímenes cortos de quimioterapia, o quimioterapia y radioterapia no simultáneas, se observó que el tratamiento agresivo reducía la mortalidad de manera significativa en los subtipos clásico y mesenquimal, mostrando una tendencia a dicha reducción en el neural. No se encontraron diferencias significativas en pacientes con GBM proneurales.

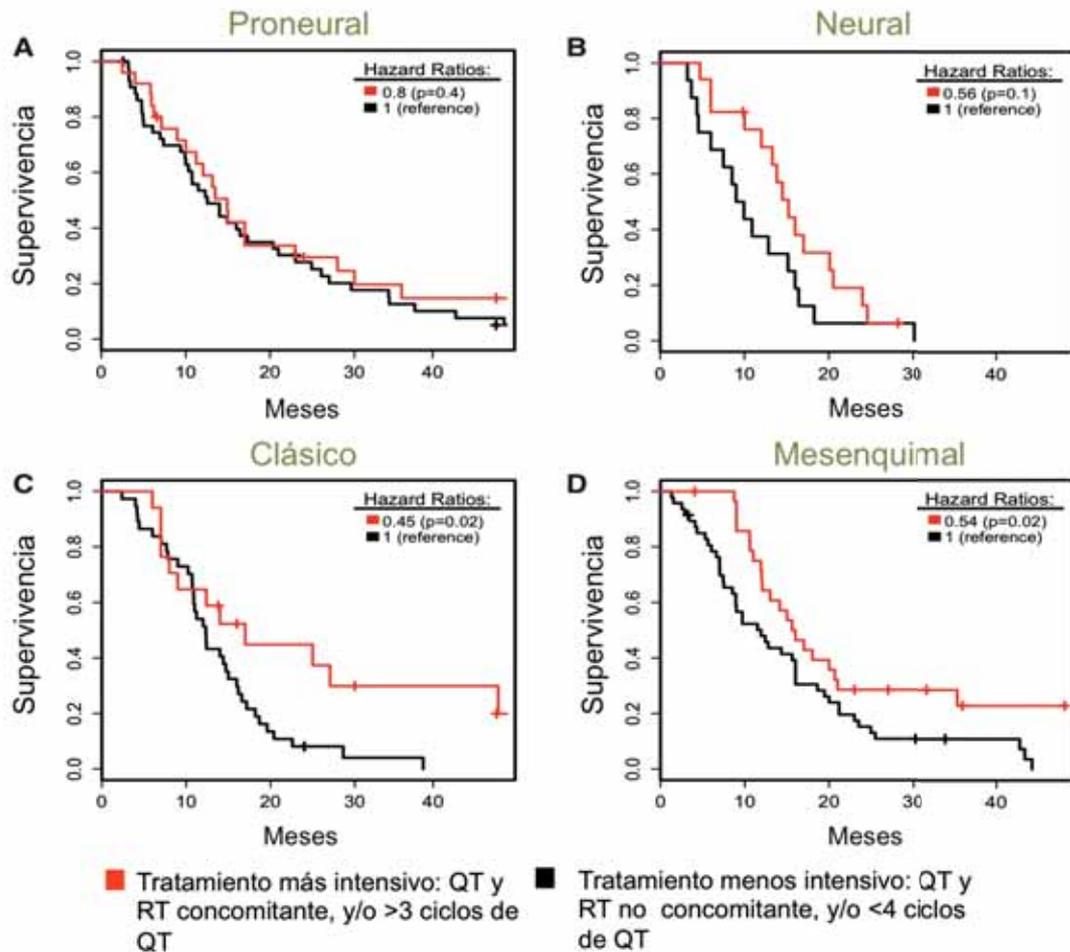


Figura 1.22. Curvas de supervivencia por subtipo de GB y tratamiento más o menos intensivo. Diferencias significativas en subtipos clásico y mesenquimal. Modificado de Verhaak et al, 2010⁹⁷.

I.2. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR EN LA TRANSFORMACIÓN NEOPLÁSICA

En la transformación maligna, la “célula neoplásica” ha de acumular una serie de alteraciones en la fisiología celular, en las principales vías bioquímicas, para adquirir potencial de invasividad y metástasis de los tumores malignos.

Tras los clarificantes trabajos de Hannahan y Weinberg^{99,100} se ha propuesto que, en cada una de estas vías, hay múltiples alteraciones genéticas que pueden estar implicadas y que se pueden encontrar mutadas o alteradas en los tumores humanos. Esta aproximación bioquímica/molecular explica la gran redundancia de alteraciones moleculares que se observan en tumores humanos, dado que lo importante es la alteración funcional donde hay múltiples alteraciones genéticas que pueden llevar al mismo defecto o alteración bioquímica.

Las alteraciones en la fisiología celular que colectivamente llevarán a un crecimiento tumoral son: autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a factores inhibidores del crecimiento, evasión de la apoptosis, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida, capacidad de invadir tejidos y metastatizar⁹⁹. Recientemente se han añadido a esta lista la capacidad de evadir un ataque inmunológico y la capacidad de reprogramar el metabolismo celular para aguantar de manera más efectiva el crecimiento tumoral¹⁰⁰. Además de estas características distintivas, se han descrito unas condiciones que facilitan y permiten que se den las alteraciones descritas: la presencia de inflamación que puede promover el crecimiento tumoral, y la inestabilidad genómica, que otorga alteraciones cromosómicas a las células tumorales que permiten la progresión tumoral.

INTRODUCCIÓN

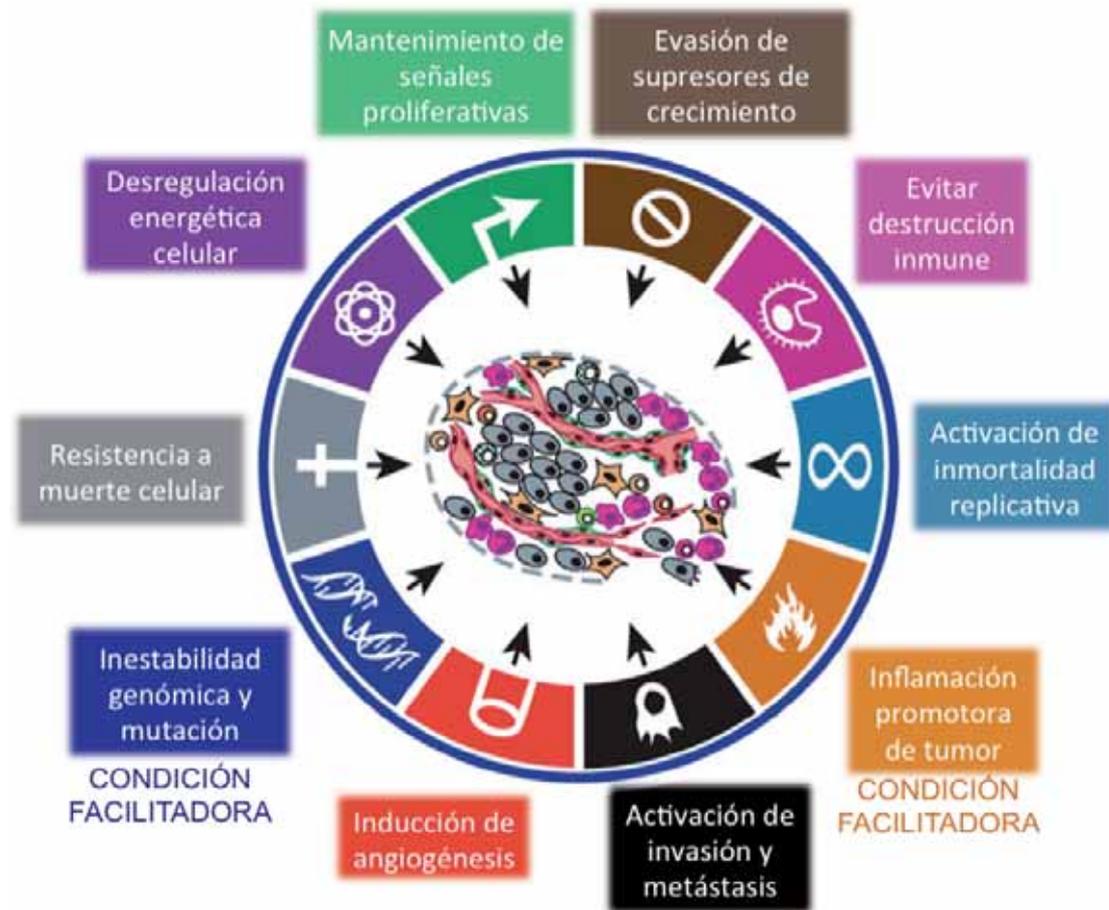


Figura 1.23. Características distintivas y condiciones facilitadoras de cáncer (modificado de Hanahan y Weinberg, 2011¹⁰⁰).

1.2.a. Concepto de vías de señalización celular

La capacidad de una célula de percibir y responder correctamente a su microentorno es esencial para su supervivencia, es la base del desarrollo celular, reparación tisular e inmunidad, así como de la homeostasis de un tejido normal. La señalización celular forma parte de un sistema complejo de comunicación que dirige las actividades celulares básicas y coordina las acciones celulares. Con el término “vías de señalización” se hace referencia al camino que sigue una determinada señal celular en su transducción (“proceso por el que una célula convierte una determinada señal o estímulo exterior en otra señal o respuesta específica”).

La transmisión de señales puede hacerse entre dos elementos de una misma célula, de manera intracelular (señal intracrina) o bien mediante la secreción de factores que actúan sobre receptores de la misma célula (señal autocrina). Dos células pueden comunicarse por señales juxtacrinas si se tocan, señales paracrinas si están cerca o endocrinas si la distancia entre las células es grande.

Cada señal extracelular es transmitida a través de múltiples rutas, o cascadas de señalización, en las que intervienen numerosas proteínas.

En lo que concierne a la proliferación celular, existen diferentes vías de señalización que llevan la señal proliferativa desde la membrana celular al núcleo. Distintas alteraciones en diferentes puntos de estas vías pueden provocar un crecimiento descontrolado. Las principales vías de señalización proliferativas son RAS-Raf-MAPK y PI3K-AKT-mTOR. Independientemente de donde se inicie la señal proliferativa, ésta tendrá que pasar, de manera inexorable, por una serie de puntos finales que reflejarán el estado proliferativo de la célula tumoral.

1.2.b. Vía de RAS-Raf-MAPK

Ras es una pequeña molécula que se activa por la unión de citoquinas, mitógenos o factores de crecimiento a sus correspondientes receptores. Esto hace que el Ras inactivo intercambie GDP por GTP y tenga lugar un cambio conformacional mediante el cual se activa Ras. Éste puede entonces reclutar a Raf (Rapidly accelerated fibrosarcoma) en la membrana celular. Esta localización en la membrana celular activa Raf. Esta serín-treonín quinasa fosforila y activa MEK (MAPK/ERK kinase), que es capaz de activar MAPK/ERK (Mitogen Activated Protein Kinase/Extracellular signal Regulated Kinase). Finalmente MAPK activa MNK 1 y 2, que fosforilan eIF4E, iniciando la traducción proteica.

INTRODUCCIÓN

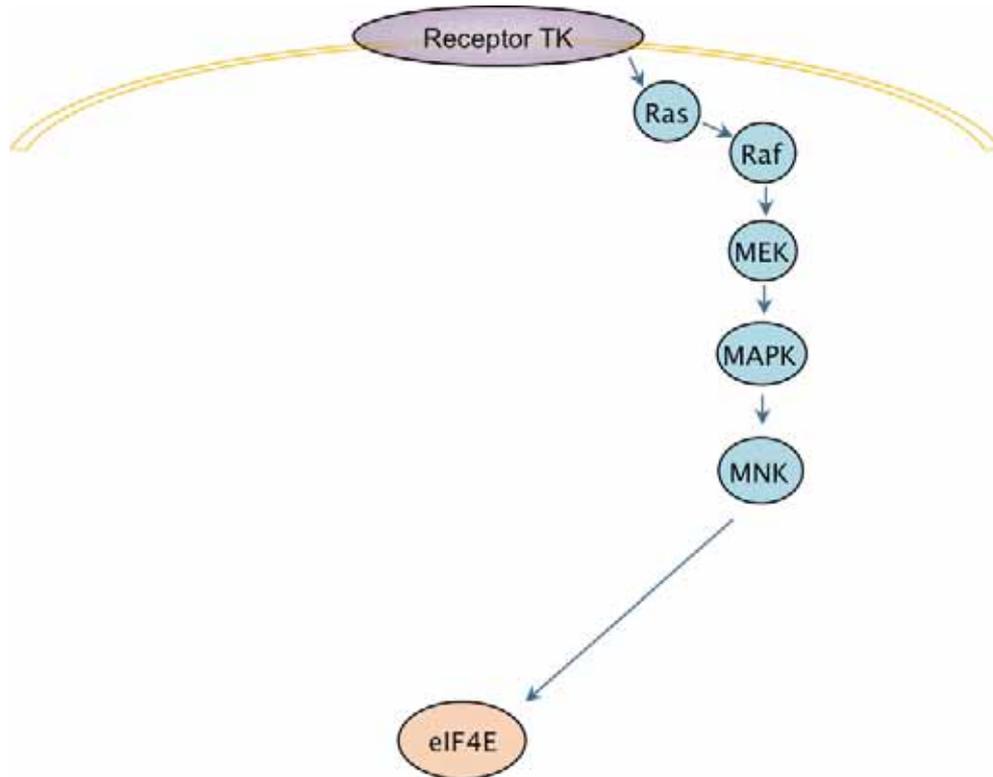


Figura 1.25. Vía de Ras-Raf-MAPK. La señal recibida por un receptor tirosín-quinasa es transmitida a través de la cadena Ras-Raf-MEK-MAPK-MNK y finalmente eIF4E.

1.2.c. Vía de PI3K-AKT-mTOR¹⁰¹

Esta vía se activa inicialmente en la membrana de la célula, y la señal activadora se propaga a través de PI3K. La activación de PI3K puede darse mediante receptores tirosín-quinasa de factores de crecimiento, proteínas G, moléculas de adhesión celular y oncogenes. El producto de la activación de PI3K, PIP3 (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato), se une a PDK1 y a AKT, que se traslocan a la membrana y se activan. La colocalización de AKT y PDK1 resulta en una fosforilación de AKT en THR308 y su activación parcial. Para la activación completa de AKT es necesaria su fosforilación en Ser473 por PDK2. PI3K tiene un factor antagonista, PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), que ejerce su efecto a través de la defosforilación de PIP3. Una vez activada, AKT se traslada al citoplasma y al núcleo, donde ejerce distintas funciones sobre dianas subyacentes con el fin de regular el metabolismo celular, la síntesis proteica, la supervivencia celular y progresión del ciclo celular. Entre estas dianas destaca mTOR (mammalian Target Of Rapamycin), que puede ser activado directamente por AKT mediante fosforilación, o bien activado indirectamente a través del complejo de esclerosis tuberosa-2 (TSC2 o tuberina),

que al fosforilarse deja de ejercer su efecto supresor sobre mTOR. mTOR a su vez fosforila S6K y 4E-BP1. Esta fosforilación activa la proteína ribosomal S6K, pero inhibe la acción supresora que ejerce 4E-BP1 sobre eIF4E: al fosforilarse, 4E-BP1 libera eIF4E, que queda libre para iniciar el proceso de traducción proteica.

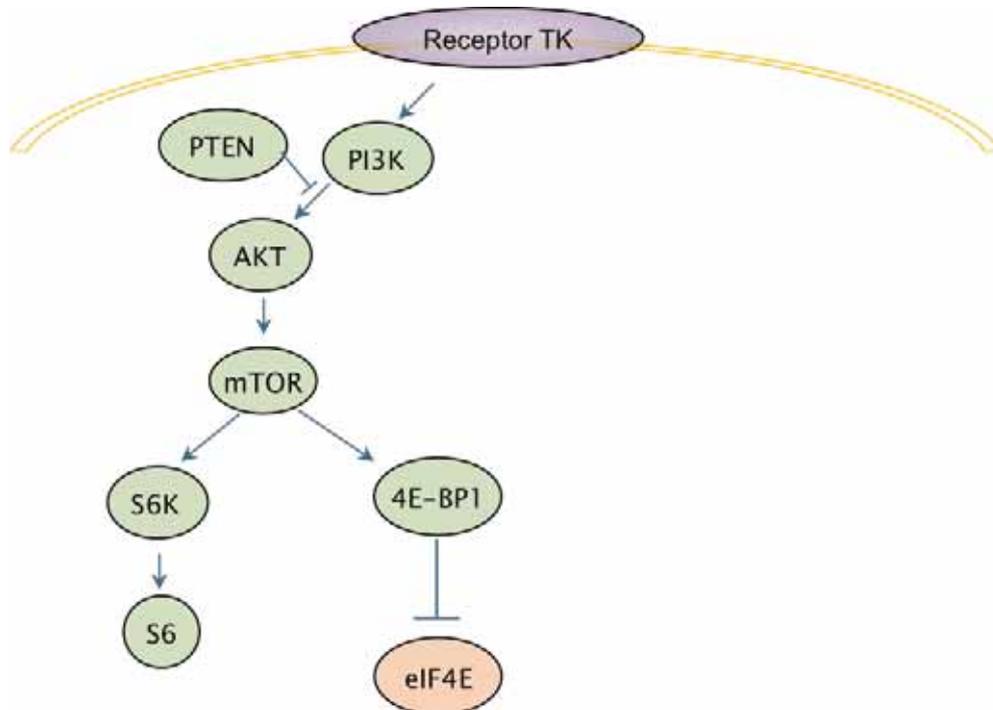


Figura 1.26. Vía de PI3K-AKT-mTOR. La señal recibida por un receptor tirosín-quinasa de membrana es transmitida a través de PI3K, AKT y mTOR, con control inhibitorio de PTEN. mTOR actúa sobre sus dos principales dianas, S6K y 4E-BP1, activando S6 y liberando eIF4E de la acción bloqueadora de 4E-BP1.

La serín/treonín kinasa p70S6K o S6K es una de las más importantes dianas de mTOR. Aunque puede activarse por otras vías, su fosforilación por mTOR es necesaria para su activación, y los tres sitios de fosforilación que se han identificado en esta proteína pueden bloquearse por inhibidores de mTOR. Al fosforilarse, S6K fosforila S6. S6, componente de la subunidad ribosomal 40S, es el principal sustrato de S6K, aunque no el único. Su fosforilación tiene un papel importante en el tamaño y proliferación celular, y en la homeostasis de la glucosa¹⁰².

4E-BP1 es una proteína de unión al factor eucariota de iniciación 4E (eIF4E), que juega un papel crítico en el control de la síntesis proteica y, por lo tanto, en el crecimiento y la supervivencia celular. Durante la traducción dependiente de cap, eIF4E se une a la estructura cap del RNA mensajero y promueve la formación del complejo de iniciación eIF4F y la unión al ribosoma. Cuando 4E-BP1 está activo, es decir, no fosforilado, se une a eIF4E e impide la formación del complejo eIF4F: se

INTRODUCCIÓN

bloquea la traducción y se favorece la apoptosis celular. En el caso contrario, cuando 4E-BP1 se fosforila, su afinidad por eIF4E disminuye, éste se libera y puede tener lugar la traducción dependiente de cap.

1.2.d. Traducción proteica

El mecanismo por el que la información contenida en el RNA mensajero se transforma en proteínas se conoce como “traducción proteica”, y tiene lugar en los ribosomas. En organismos eucariotas cada RNA mensajero suele codificar una única proteína (RNA monocistrónico). Las hebras de RNA tienen en su extremo 5' una guanina metilada o una estructura “Cap”. Después de ésta, la hebra de RNAm presenta una zona cuya información no se traduce (región no traducida 5', RNT5') pero es importante porque su longitud, composición de nucleótidos y estructura determinarán la eficiencia con la que se traduce la hebra. A continuación de la RNT5' se encuentra el codón de inicio de síntesis proteica (que suele ser AUG), la región codificante, un codón de parada (UAA, UAG o UGA), una RNT 3' y finalmente una cola de diversas adeninas (cola poliA).



Figura 1.27. Esquema de hebra de RNAm.

En condiciones favorables, el ribosoma se une a la hebra de RNAm por su estructura Cap. Aquí intervienen los factores eucarióticos de iniciación (eIFs), proteínas que juegan distintos papeles en la síntesis proteica (reconocer el extremo Cap, dirigir la unión del ribosoma a la hebra de RNAm, reconocer el RNAm maduro que puede traducirse, etc); son por lo tanto un factor limitante para iniciar la traducción. Sin embargo, algunos RNAm (celulares y víricos) pueden traducirse cuando la traducción cap-dependiente se ve limitada, con la denominada traducción cap-independiente: en vez de iniciar la traducción con la unión del ribosoma al extremo cap, se inicia con la unión del ribosoma a una región específica dentro de la RNT 5' denominada sitio interno de entrada del ribosoma, IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) que se encuentra cercano al codón de inicio¹⁰³.

Uno de los elementos importantes para el inicio de la traducción es al formación del

complejo eIF4F, compuesto por tres subunidades: eIF4E, eIF4A y eIF4G¹⁰⁴. El factor eucariota de iniciación de la traducción eIF4E es un componente central en la iniciación y regulación de la traducción en células eucariotas¹⁰⁵: a través de su interacción con la estructura Cap 5' del RNA mensajero, eIF4E une la hebra de este RNAm con el ribosoma. Es el factor de iniciación menos abundante en número de moléculas por célula, lo que lo convierte en un punto clave para la regulación de la traducción. Tiene un único sitio de fosforilación, mediante el cual interactúa con eIF4G y 4E-BP1. eIF4G es una proteína de anclaje importante en el reclutamiento del ribosoma al RNAm, que, además del eIF4E, interacciona con otros componentes de la maquinaria traduccional, como eIF4A.

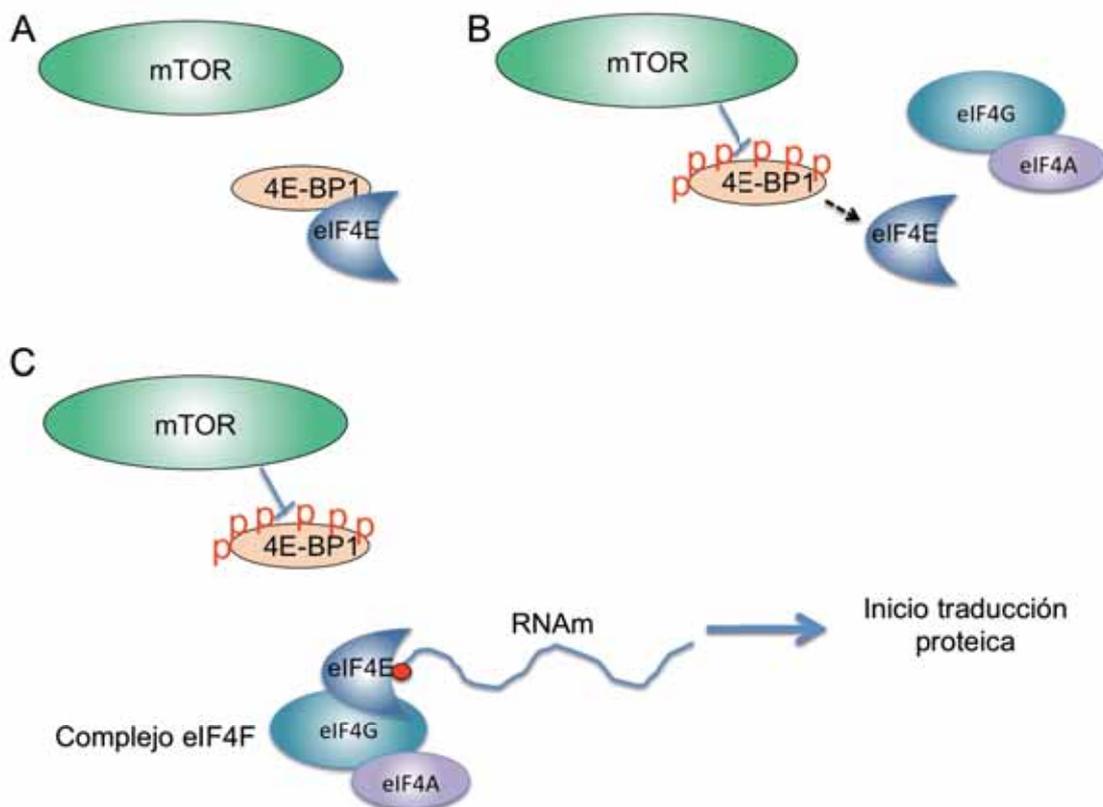


Figura 1.27. Esquema simplificado del inicio de la traducción. A. 4E-BP1 se encuentra unido a eIF4E y bloquea el inicio de la traducción. B. mTOR actúa inhibiendo 4E-BP1 (fosforilándolo) y libera eIF4E. C. El eIF4E libre se une a eIF4G y eIF4A, formando el complejo iniciador de la traducción eIF4F. eIF4E recluta la hebra de RNAm uniéndose al extremo 5' de la hebra, y se inicia la traducción con su unión al ribosoma.

INTRODUCCIÓN

II. HIPÓTESIS

II. HIPÓTESIS DE TRABAJO:

La señal proliferativa puede seguir distintos caminos, desde la membrana celular al núcleo y a los ribosomas para controlar la síntesis proteica. Todas estas vías convergen en unos factores que regulan la traducción del RNA y la síntesis proteica. Por tanto, los niveles de estos factores y su actividad nos permitirían reconocer el estado de las vías de señalización celular en una neoplasia y, eventualmente, desarrollar terapias contra esa diana, independientemente de la alteración genética desencadenante.

En los últimos años se ha estudiado en nuestro laboratorio la expresión de proteínas implicadas en estas vías, en tumores de mama, próstata, ovario, endometrio y colon. No sólo se han estudiado las distintas interacciones entre dichas moléculas, sino también la correlación entre la expresión de estos factores y el estadio clínico de la progresión tumoral y la supervivencia del paciente. Los resultados obtenidos señalan que el factor 4EBP1 y su proteína de unión eIF4E como posibles factores clave y puntos de convergencia de diversas vías oncogénicas (“factores embudo”). Dado que hay pocos estudios sobre este abordaje, y sobre factores en tumores astrocitarios difusos y en situaciones de reactividad astrocitaria no tumoral (astrogliosis), nos planteamos que los niveles de estos factores/proteínas podrían ser también centrales en la progresión maligna de los astrocitomas y en la supervivencia.

III. OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

El objetivo central del trabajo es estudiar, mediante estudio inmunohistoquímico, los principales factores de las vías de señalización celular, en una cohorte de astrocitomas infiltrantes difusos (de grado II a grado IV) y su correlación con el pronóstico y la progresión tumoral.

Como objetivos secundarios, se pretende:

1. Estudiar la expresión de distintos factores implicados en las vías de señalización y su análisis comparativo con el estado de lesiones reactivas no tumorales (gliosis).
2. Correlacionar la expresión de los distintos factores implicados en las vías de señalización y el grado de malignidad tumoral, así como con la supervivencia.
3. Estudiar la aplicación diagnóstica de la expresión de estos factores en conjunto con los datos anatomopatológicos para aportar mayor objetividad en el diagnóstico y grado de malignidad de los tumores astrocitarios.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

IV.1. Selección de los casos a estudio

Se han estudiado un total de 104 astrocitomas infiltrantes difusos, pertenecientes a 100 pacientes. Los casos han sido seleccionados retrospectivamente de los archivos del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Vall d'Hebron, entre los años 2000 y 2007, y clasificados histológicamente siguiendo la clasificación de la OMS de 2007 de tumores cerebrales. Los 104 AID corresponden a 19 astrocitomas difusos grado II (19%), 25 astrocitomas anaplásicos (24%) y 60 glioblastomas (57%). El diagnóstico se realizó en base al estudio por microscopía óptica de cortes de hematoxilina-eosina, y de técnicas inmunohistoquímicas de GFAP, p53 y Ki67. Se seleccionó un único bloque representativo por caso para el estudio de los marcadores de vías de señalización.

Se utilizaron 15 casos de astrocitosis reactiva para valorar una activación no neoplásica de las vías de proliferación celular, principalmente tejido cerebral alrededor de lesiones vasculares (9 casos de gliosis peri-malformación arteriovenosa) y alrededor de lesiones metastásicas cerebrales (2 casos de metástasis de carcinoma de mama y 4 de adenocarcinomas de pulmón).

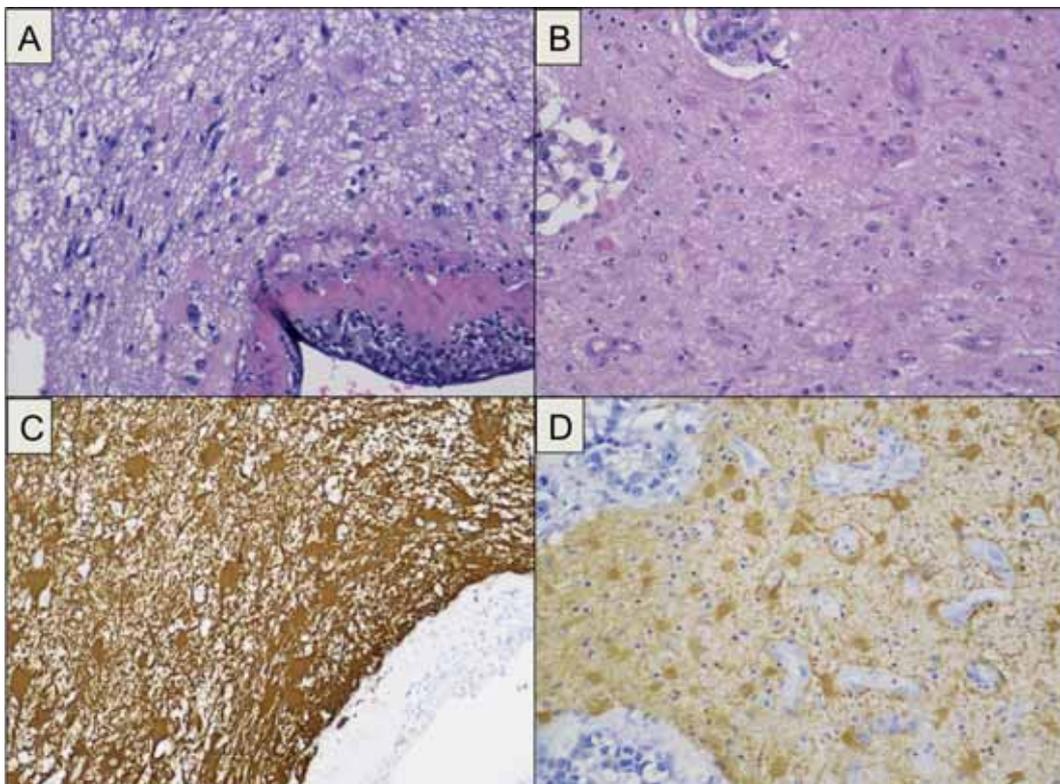


Figura 4.1. Gliosis alrededor de una malformación arteriovenosa (A, C) y de una metástasis de pulmón (B, D). A, B, hematoxilina-eosina; C, D: proteína glial fibrilar ácida.

MATERIAL Y MÉTODOS

IV.2. Recogida de datos clínico-radiológicos

Los datos clínico-radiológicos (edad, sexo, localización tumoral, tipo de resección quirúrgica) fueron recogidos retrospectivamente de las historias clínicas; los datos de supervivencia fueron recolectados utilizando el Índice Nacional de Defunciones entre enero y febrero de 2012. Esto supone un seguimiento mínimo de 48 meses.

IV.3 Estudio inmunohistoquímico

Se realizó, en todos los casos, estudio inmunohistoquímico con anticuerpo monoclonal de ratón contra EGFR (DakoCytomation, prediluido), anticuerpo monoclonal de ratón contra PTEN (Cascade ABM 2052, 1:300), anticuerpo policlonal de conejo contra la forma fosforilada de MAPK (Cell Signaling Tech, 1:50), anticuerpo policlonal de conejo contra la forma total y fosforilada de 4E-BP1 (Cell Signaling Tech, 1:100), anticuerpo policlonal de conejo contra la forma fosforilada de la proteína ribosomal S6 (Cell Signaling Tech, 1:50), anticuerpo policlonal de conejo contra la forma total de eIF4E (Cell Signaling Tech, 1:75) y anticuerpo monoclonal de conejo contra la forma fosforilada de eIF4E (Cell Signaling Tech, 1:200), anticuerpo monoclonal de ratón contra Ki67 (DakoCytomation, 1:100) y anticuerpo monoclonal de conejo contra ciclina D1 (Ventana, prediluido). En todos los casos de glioblastoma se llevó a cabo la detección de la mutación de IDH1 R132H por estudio inmunohistoquímico (Master Diagnostica, prediluido). Ver tabla 4.1.

No disponemos de material congelado de las piezas quirúrgicas tumorales estudiadas, pero los anticuerpos fueron previamente validados mediante Western-Blot en nuestro laboratorio para estudios de neoplasias ováricas, endometriales y mamarias¹⁰⁶⁻¹⁰⁸.

Procedimientos

Se seleccionó un único bloque representativo de cada caso, algunos de ellos incluyendo corteza cerebral. El tejido fue fijado en formalina tamponada al 10%, y conservado en bloques de parafina. Se realizaron cortes de 3 μ m de los bloques originales, utilizando laminillas con carga electrostática.

La inmunohistoquímica se realizó mediante procedimiento automatizado, utilizando el módulo de tinción Benchmark XT. Los anticuerpos 4E-BP1, p4EB-P1, pS6, pMAPK, eiF4E, peiF4E, p53, Ki67, IDH1 y ciclina D1 fueron puestos a punto mediante el kit ultraView Universal DAB Detection de Ventana Medical Systems, que

se basa en un sistema indirecto y desprovisto de biotina para detectar IgG de ratón, IgM de ratón y anticuerpos primarios de conejo.

Una vez hechos los cortes, las preparaciones se hornearon durante al menos 2 horas a 60°C para proporcionar una adecuada adhesión del tejido al portaobjetos y se colocaron en el módulo de tinción para proceder al protocolo automatizado diseñado para cada uno de los anticuerpos (ver tabla 4.1). El módulo de tinción Benchmark XT utiliza un sistema automatizado propio. Cada paso incuba durante un tiempo y a una temperatura determinada. El desparafinado se realiza mediante la solución EZ prep™ (10x) y el desenmascaramiento se lleva a cabo con la solución Cell Conditioning 1, prediluida, a pH 8. Una vez realizado el desenmascaramiento a pH 8, las muestras se bloquean con solución de peróxido de hidrógeno al 3%. El anticuerpo primario se localiza mediante un anticuerpo secundario marcado con una enzima y a continuación, el complejo resultante se visualiza utilizando un producto enzimático que precipita (sustrato de peróxido de hidrógeno y cromógeno de tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobencidina, DAB). Finalmente se realiza contratinción con hematoxilina 8 minutos y post-contratinción con Blue reagent, 4 minutos.

Una vez finalizado el proceso automatizado, las preparaciones se lavan, se deshidratan y se procede a su montaje siguiendo el procedimiento habitual.

En el caso del PTEN anti-hu (clon 6h 2.1, anticuerpo monoclonal de ratón de Cascade, ABM-2052), una vez desparafinadas las muestras con xileno y alcoholes se realiza el desenmascaramiento con EDTA a pH 9 (10 mM) durante 4 minutos a 115°C en microondas. Las muestras se tratan con peróxido de hidrógeno al 3% (de DAKO) durante 5 minutos, después de los lavados se realiza la incubación con el anticuerpo primario a 1/300 O/N a 4°C.

El EGFR se realizó mediante el módulo de tinción Autoestainer plus de Dako. Una vez desparafinado el tejido con xileno y alcoholes, se procede al desenmascaramiento con proteinasa K, 5 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se tratan con peróxido de hidrógeno al 3%, de Dako, durante 5 minutos. Se realiza incubación con anticuerpo primario durante 30 minutos, prediluido.

Tanto el anticuerpo de PTEN como el de EGFR, tras incubación con el primario, se localizan con un anticuerpo secundario Labelled Polymer-HRP otros 30 minutos y finalmente se marcan con DAB y se contratiñen con hematoxilina de Harris.

MATERIAL Y MÉTODOS

Anticuerpo	Sitio de fosforilación	Casa comercial	Tipo	Dilución	Tiempo de incubación (min)
EGFR	Clon 2-18C9	Dako	MM	Prediluido	30'
PTEN	Clon 6h 2.1	Cascade ABM 2052	MM	1:300	O/N 4°C
pMAPK		Cell Signaling Tech	R	1:200	60'
4E-BP1	Ser112	Cell Signaling Tech	RP	1:50	60'
p4E-BP1	Thr70	Cell Signaling Tech	RP	1:50	60'
pS6		Cell Signaling Tech	RP	1:100	32'
eIF4E	Ser209	Cell Signaling Tech	RP	1:75	60'
peIF4E	Clon EP2151Y	Abcam	RM	1:200	60'
Cyclin D1	Clon SP4	Ventana	RM	Prediluido	
P53	DO-7	Dako		1:20	
Ki67	MIB1	Dako	MM	1:100	
IDH1 R132H	Clon H09	Master Diagnostica		Prediluido	20'

Tabla 4.1. Resumen de los anticuerpos utilizados, dilución y tiempo de incubación. MM: monoclonal de ratón (*mouse monoclonal*), RP: policlonal de conejo (*rabbit polyclonal*), RM: monoclonal de conejo (*rabbit monoclonal*).

Valoración inmunohistoquímica

La valoración inmunohistoquímica se realizó en un microscopio óptico Leitz Dialux 20, y las imágenes se tomaron con una cámara Nikon DS-U3 conectada a un microscopio Nikon Eclipse Ci. No se realizó estudio inmunohistoquímico de EGFR en los casos de gliosis.

Se realizó una valoración semicuantitativa de la expresión de los anticuerpos EGFR, PTEN, pMAPK, p4E-BP1, 4E-BP1, pS6, peIF4E y eIF4E, llevada a cabo por un patólogo (neuropatólogo). Se tuvo en cuenta el porcentaje de células neoplásicas teñidas (de 0 a 100%), y la intensidad de la expresión (0: nula, 1: leve, 2: moderada y 3: intensa). De esta manera, multiplicando el porcentaje de células teñidas por la intensidad de expresión, y teniendo en cuenta la heterogeneidad en la expresión proteica de los tumores, se obtuvo un Histscore de 0 a 300. Por ejemplo, para un tumor con un 20% de intensidad 1, 50% de intensidad 2 y 10% de intensidad 3, el histoscore es de $(20 \times 1) + (50 \times 2) + (10 \times 3) = 150$. Para pMAPK se valoró de manera independiente la tinción nuclear y la citoplásmica. Los niveles de Ki67, p53 y Ciclina D1 se evaluaron como porcentaje de células teñidas (tinción nuclear). La presencia o ausencia de mutación de IDH1 R132H se valoró por presencia o ausencia de expresión del anticuerpo específico contra esta mutación.

En los casos que mostraron una expresión heterogénea, se valoró el área de mayor intensidad, siempre que ésta representara al menos un 10% del tejido. En caso contrario se tuvo en cuenta la expresión global.

Se tuvo en cuenta la tinción de neuronas y endotelios como control positivo en aquellos anticuerpos en los que se hubiera descrito dicha positividad.

IV.4. Estudio mutacional

En algunos casos de GBM se realizó estudio de mutaciones en el codón 132 del gen *IDH1* mediante PCR y secuenciación.

Extracción de ADN de muestras parafinadas:

Se prepara la muestra 48 horas antes de la extracción. El primer día se centrifuga la muestra 1 min a 13200 rpm (Centrifuge 5415 R, *Eppendorf*), se calienta sin agitación en la Thermomixer comfort (*Eppendorf*) a una temperatura de 75°C durante 5 minutos, se añaden 190 µl de Buffer G2 (*Qiagen*) y se incuba a 75°C durante 5 minutos en agitación en la thermomixer. Posteriormente se añaden 10 µl de Proteinasa K (*Qiagen*), se vortea y se incuba toda la noche en la thermomixer a 56°C y a 1400 rpm. El segundo día se vuelven a añadir 10 µl de Proteinasa K, se vortea y se incuba a 56°C en la thermomixer a 1400 rpm. Al día siguiente se centrifuga la muestra 1 min a 1200 rpm, se añaden 2 µl de glicógeno y se homogeneiza la muestra con una pipeta en el caso de que queden restos de tejido. Se pipetea la parte del fondo del eppendorf en un tubo de extracción y se coloca en el extractor de ácidos nucleicos Bio-Robot EZ-1 (*Qiagen*) con la tarjeta de parafina y con un volumen final de elución de 100 µl.

Una vez hecha la extracción, el ADN obtenido se cuantifica con el *Nanodrop Spectrophotometer ND-1000* (valores en ng/µl). Esto marca el volumen de la muestra requerido para poder realizar las PCRs posteriores. Se realiza una PCR de actina para comprobar la calidad del ADN.

Estudio mutacional de IDH1:

El análisis de las muestras empieza por una PCR amplificando IDH1. Para ello se empleó un termociclador *Eppendorf* donde las condiciones por ciclo fueron de 96°C durante 2 min y 30 ciclos de 96°C durante 10 segundos, 50°C 5 segundos y 60°C durante 4 min. Los primers empleados son los que se muestran en la siguiente tabla, 4.2.

MATERIAL Y MÉTODOS

Oligo	Secuencia
F	TGTAACGACGGCCAGTCGGTCTTCAGAGAAGCCATT
R	CAGGAAACAGCTATGACCGCAAATCACATTATTGCCAAC

Tabla 4.2 Secuencias de los primers usados para el estudio mutacional de IDH1. F = Forward. R = Reverse.

Purificación de los productos de PCR mediante EXO SAP-IT:

Los productos de la PCR son purificados a partir del tratamiento enzimático del KIT EXO SAP-IT[®] (Exonuclease I and Shrimp Alkaline Phosphatase, *USB Corporation*). Ésta elimina los primers y los nucleótidos no incorporados durante la reacción, que podrían causar interferencias en la reacción de secuenciación.

Para llevar a cabo este procedimiento se mezclan 5 µl del producto de la PCR + 1 µl de la EXO SAP-IT, se incuban durante 15 min a 37°C para degradar el exceso de primers y nucleótidos, y otros 15 min a 80°C para inactivarla.

Reacción de secuenciación:

Se añade a cada eppendorf 2 µl del producto obtenido de la purificación por EXO SAP-IT, 1 µl de Big Dye Terminator version 3.1 cycle sequencing KIT (*Applied Biosystems*), 1 µl del cebador forward o reverse correspondiente a una concentración de [3.2 µM], 1.5 µl de Big Dye Terminator version 3.1 5x sequencing buffer (*Applied Biosystems*) y 4.5 µl de agua Milli-Q.

Condiciones de la PCR: (96°C, 2min) + [(96°C, 10 sec), (50°C, 5 sec), (60°C, 4 min)] x 30 ciclos.

Purificación de la reacción de secuenciación:

El Montage SEQ₉₆ Sequencing Reaction Cleanup KIT (*Millipore*) contiene una placa de filtración y la solución necesaria para eliminar las sales contaminantes y los fluorocromos no incorporados en las reacciones de secuenciación de ADN. La purificación de la reacción de secuenciación consiste en añadir al producto de la reacción de secuenciación 20 µl de la Solución de Inyección, mezclar, traspasarlo todo al fondo de un pocillo de la placa de filtración, SEQ₉₆ y hacer el vacío a 23-25" Hg hasta que quede vacío. Posteriormente se añaden 35 µl de la Solución de Inyección a cada pocillo y se hace el vacío hasta que la solución haya sido eliminada completamente del pocillo. Se añaden 20 µl de la Solución de Inyección a cada pocillo, se resuspenden pipeteando arriba y abajo unas 20 veces y se incorporan a la placa de inyección, Optical 96-Well Reaction Plate (*Applied Biosystems*).

Secuenciación e interpretación de los datos:

En un Analizador genéticos 3130 (ABI 3130, *Applied Biosystems*), se procesan las muestras con el polímero POP-7 (*Applied Biosystems*). Una vez obtenida la secuencia se hace un alineamiento múltiple con una secuencia estandarizada mediante el programa Clustal W para ver las similitudes y detectar mutaciones. Con el programa Chromas Pro se puede corregir la secuencia si ésta no ha sido bien leída por el GeneMapper Software que contiene el ABI 3130.

IV.5. Análisis estadístico

Se realizó el análisis estadístico utilizando el programa Statistical Package for Social Science (*SPSS 20.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA*). Una diferencia se consideró estadísticamente significativa cuando el p-valor era igual o inferior a 0,05. Se consideraron variables cuantitativas la edad, el grado histológico, la actividad proliferativa (Ki67), ciclina D1, p53 y el Hscore de las proteínas estudiadas. Se consideraron variables cualitativas el sexo, la localización, la lateralidad y la presencia de mutación de IDH1.

Se utilizaron pruebas de Chi-cuadrado para variables cualitativas. Para los estudios de comparación de variables cuantitativas de distribución normal se utilizó la T-Student y correlación de Pearson. Para variables cuantitativas de distribución no normal, se utilizaron tests no paramétricos de Rho de Spearman y U de Mann-Whitney.

Se utilizaron curvas Roc para calcular puntos de corte con mayor sensibilidad y especificidad para diagnóstico de alto grado o GBM, para cada uno de los marcadores. Una vez identificado este punto, se analizó la relación con supervivencia mediante curvas de Kaplan-Meier, utilizando el log-rank como estadístico de contraste. Se realizaron módulos de regresión logística para identificar qué parámetros se asociaban de manera independiente a alto grado o a GBM.

El análisis multivariante se hizo con el modelo de regresión de Cox, con el fin de hallar el valor pronóstico independiente de cada una de las variables analizadas.

V. RESULTADOS

V. RESULTADOS

V.1. Parámetros clínico-patológicos

V.1.a. Edad y sexo

La distribución por sexos de la población estudiada fue de 37 mujeres (37,4%) y 61 hombres (62,6%), con un ratio de hombres:mujeres de 1,67:1. La edad media en el momento del diagnóstico fue de 53 ±15,7 años. El grupo de pacientes con astrocitomas grado II estaba compuesto por 12 hombres y 7 mujeres (60% y 40% respectivamente, ratio H:M de 1,5:1), con una edad media de 43,53 ±17,9 años. Los 24 casos de astrocitomas anaplásicos correspondían a 21 hombres (84%) y 4 mujeres (16%), con un ratio H:M de 7,3:1, y una edad media de 43,1 ±14,3 años. El grupo de GBMs estaba compuesto por 33 hombres (55%) y 27 mujeres (45%), con un ratio H:M de 1,2:1 y una edad media de 60,3 ±11,2 años. Las diferencias de edad por grupos fueron estadísticamente significativas ($p < 0,001$, figura 5.2).

La población de proliferación astrocitaria no tumoral (gliosis) se compone de 15 casos, 10 hombres y 5 mujeres, con una edad media de 46,3 años.

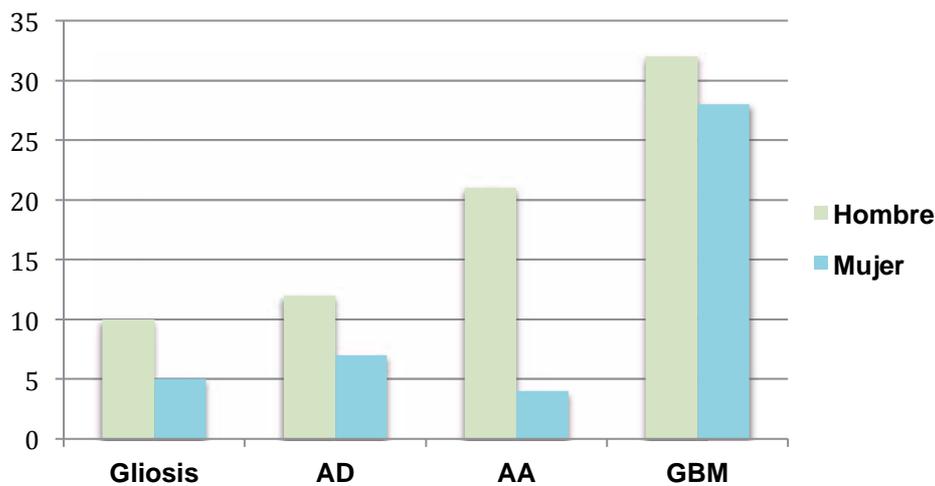


Figura 5.1. Distribución de los casos en función del sexo y grado histológico.

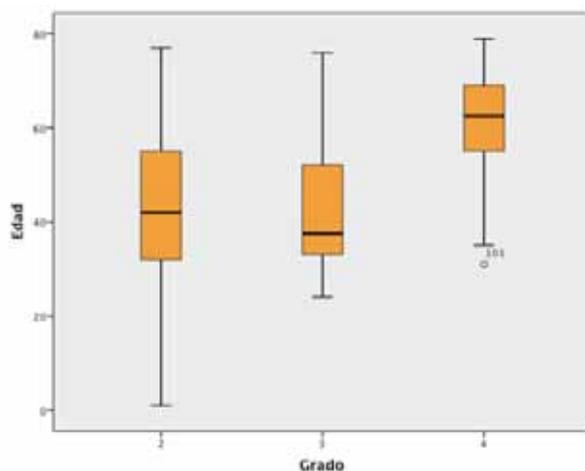


Figura 5.2. Distribución de la edad por grado histológico ($p < 0,001$).

RESULTADOS

V.1.b. Tipo de cirugía

Respecto al tipo de cirugía realizada, 34 de los 104 casos fueron lobectomías (7 grado II, 10 AAs y 17 GBMs), 37 resecciones amplias, 23 biopsias quirúrgicas y 10 biopsias estereotáxicas (fig. 5.3).

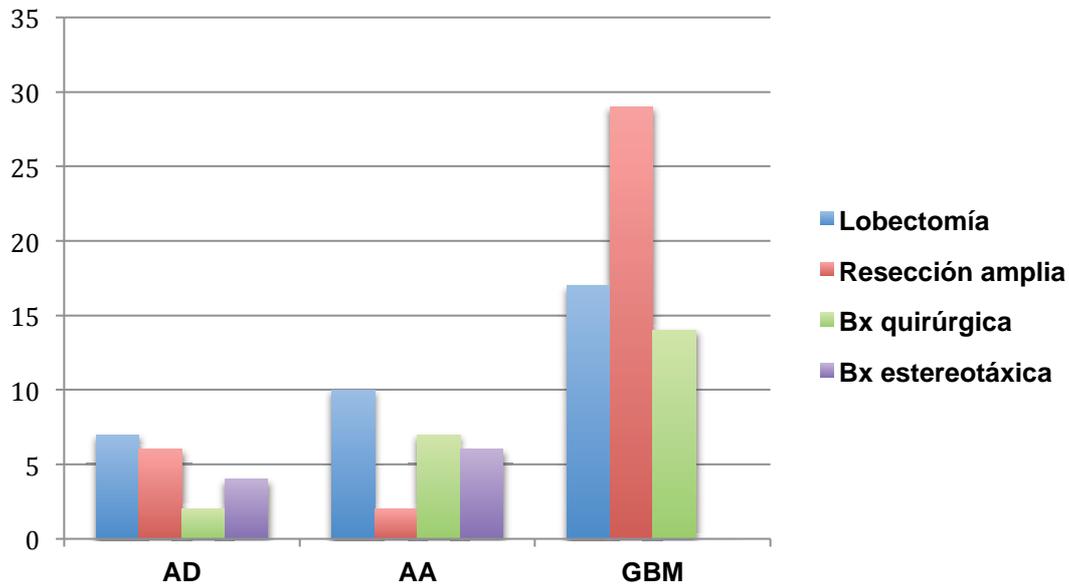


Figura 5.3. Tipo de cirugía en función del grado histológico de la lesión.

V.1.c. Localización de la lesión

La localización más frecuente fue el lóbulo frontal (30,8%), seguido del temporal (27,9%), parietal (6,7%), parieto-temporal, occipital y multifocal (3% cada una de estas localizaciones), y parieto-occipital (1,9%). Sólo se recogió un tumor de localización tálamica, uno insular, uno ttemporo-occipital y uno medular (0,9% cada uno). No se pudo concretar la localización en 21 casos de los 104 (20,1%). La distribución de la localización de los tumores por grado se ve reflejada en la figura 5.4.

En cuanto a la lateralidad de las lesiones, no hubo diferencias significativas entre derecho e izquierdo (figura 5.5).

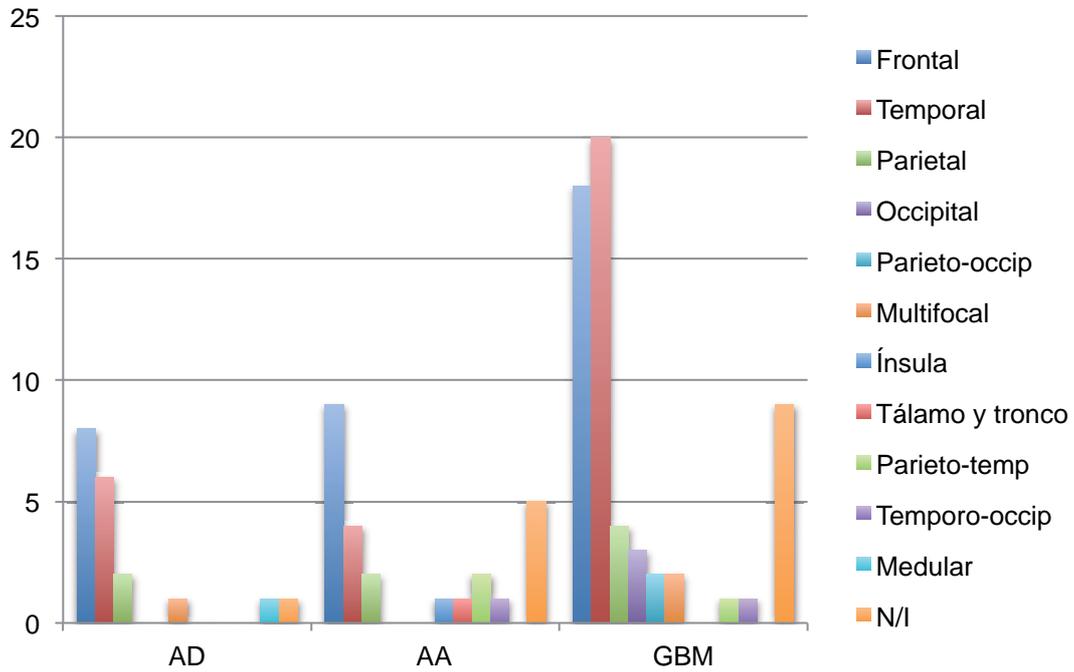


Figura 5.4. Distribución de los casos en función del grado y localización.

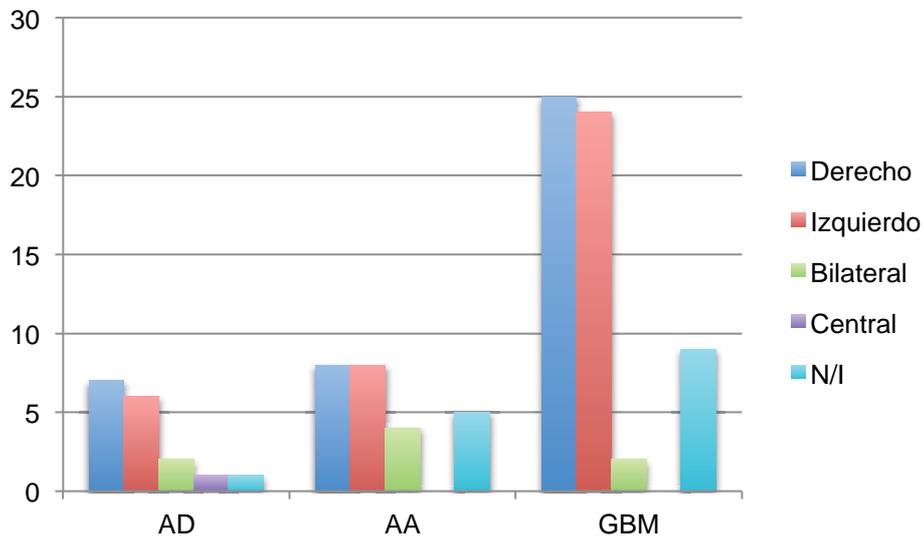


Figura 5.5. Distribución de los casos en función del grado y lateralidad.

RESULTADOS

V.1.d Supervivencia

Los porcentajes de fallecimientos, según el grado de la lesión, fueron 63,1% en AD, 56% en AA y 83,7% en GBM. La supervivencia media fue de 1007 días. La supervivencia media en los astrocitomas difusos fue de 1567,8 días de media y 1377 de mediana; en los astrocitomas anaplásicos, de 1302,2 de media y 1076 de mediana; en el caso de los GBM, los pacientes vivieron 520,5 días de media y 292 de mediana. Encontramos diferencias estadísticamente significativas entre la supervivencia de los distintos grados histológicos ($p < 0,001$, fig. 5.6).

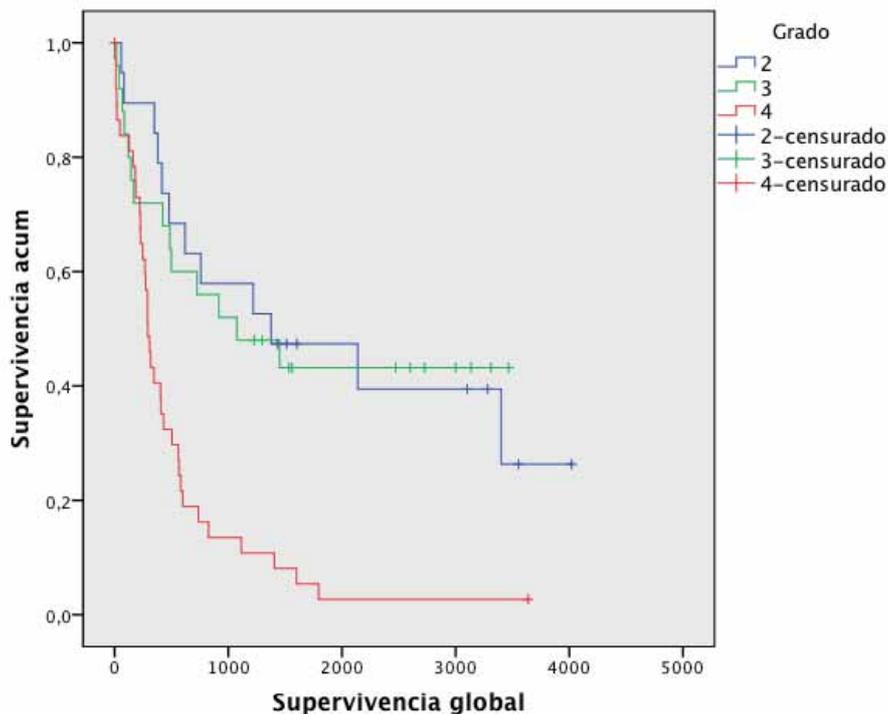


Fig. 5.6. Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) en función del grado histológico, diferencias estadísticamente significativas.

De todas las variables clínico-patológicas, únicamente la edad y el grado histológico demostraron correlación significativa con la supervivencia ($p < 0,001$ para ambas), de manera independiente.

V.2. Análisis de las vías de señalización y estudio de la proliferación celular en astrocitomas infiltrantes difusos

V.2.a. EGFR

Se observa expresión inmunohistoquímica de EGFR en membranas celulares del tumor, sin tinción neuronal ni de células endoteliales. La mediana de expresión de esta proteína, por grado, es: 140 en AD [IC 95%: 0-228], 140 en AA [IC 95%: 0-300], y 225 en GBM [IC 95%: 13-300]. Existe un aumento estadísticamente significativo de la expresión de EGFR conforme aumenta el grado tumoral ($p=0,015$).

EGFR		
	Mediana	IC [5-95%]
Gliosis	-	-
AD	140	0-228
AA	140	0-300
GBM	225	13-300

Tabla 5.1. Valores de Hscore de EGFR en astrocitomas difusos, astrocitomas anaplásicos y glioblastomas (estudio inmunohistoquímico no realizado en los casos de gliosis).

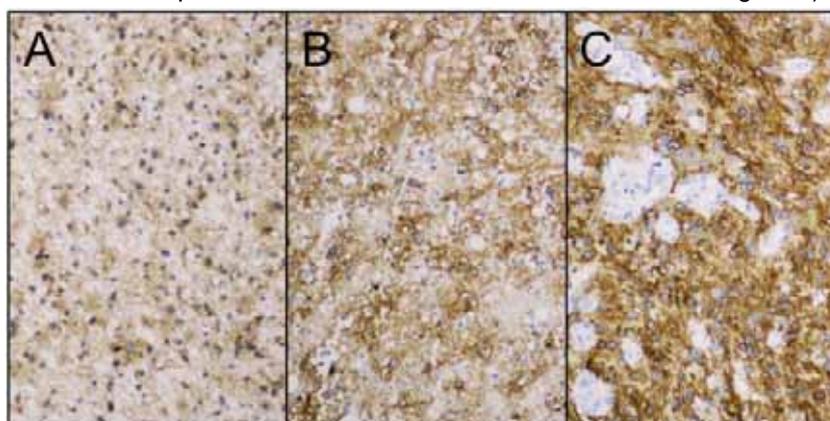
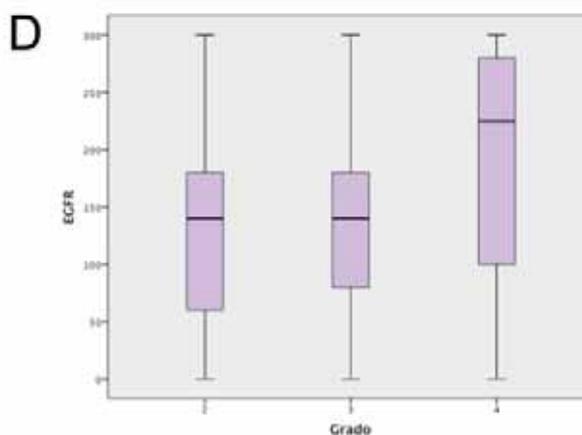


Fig. 5.7. Expresión de EGFR en astrocitomas difusos (A), astrocitomas anaplásicos (B) y glioblastomas (C), 200x. Diagrama de cajas comparando los niveles de expresión en los distintos grados histológicos (D), con diferencias significativas ($p=0,015$).



RESULTADOS

El punto de corte con mejor sensibilidad y especificidad en los valores de Hscore de EGFR (tabla 5.2) para el diagnóstico de alto grado vs bajo grado, y de GBM vs astrocitoma de otro grado, fue de 200 (hallado mediante estudio con curvas Roc). Con valores de EGFR mayores a este punto de corte se engloba al 45,5% de los AID de alto grado, del total de AID (*sensibilidad*); con valores inferiores o iguales se engloba al 88,2% de los AID de bajo grado (*especificidad*). El *valor predictivo positivo* (VPP) de un EGFR superior a 200 es de 93,8%, es decir, con este dato podemos diagnosticar un AID de alto grado con 93,8% de probabilidades de acertar. El *valor predictivo negativo* es del 29,4%: un tumor con EGFR igual o inferior a 200 tiene un 29,4% de probabilidades de no ser un AID de alto grado.

Los datos referidos al diagnóstico de GBM frente a otros grados tumorales se encuentran reflejados en la tabla 5.2.

En cuanto al impacto en la supervivencia (tabla 5.2, figura 5.6), el grupo con expresión de EGFR superior a 200 vivió significativamente menos, 616 días frente a 1579 en el otro grupo ($p=0,005$).

EGFR		
	Alto grado vs bajo grado	GBM vs otro grado
Punto de corte Hscore	200	200
Sensibilidad (%)	45,5	56,5
Especificidad (%)	88,2	83,8
VPP (%)	93,8	81,3
VPN (%)	29,4	60,8
p-valor	0,011	<0,001
IMPACTO SUPERVIVENCIA		
Global, p-valor	0,005	
Global, días	1579 si EGFR<200, 616 si >200	
Por grado, p-valor	ns	

Tabla 5.2. Puntos de corte de Hscore de EGFR con mejor sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de AID de bajo grado frente a alto grado (columna de la izquierda) y de GBM frente al resto de AID (columna de la derecha), con sus respectivos parámetros estadísticos y su impacto en supervivencia.

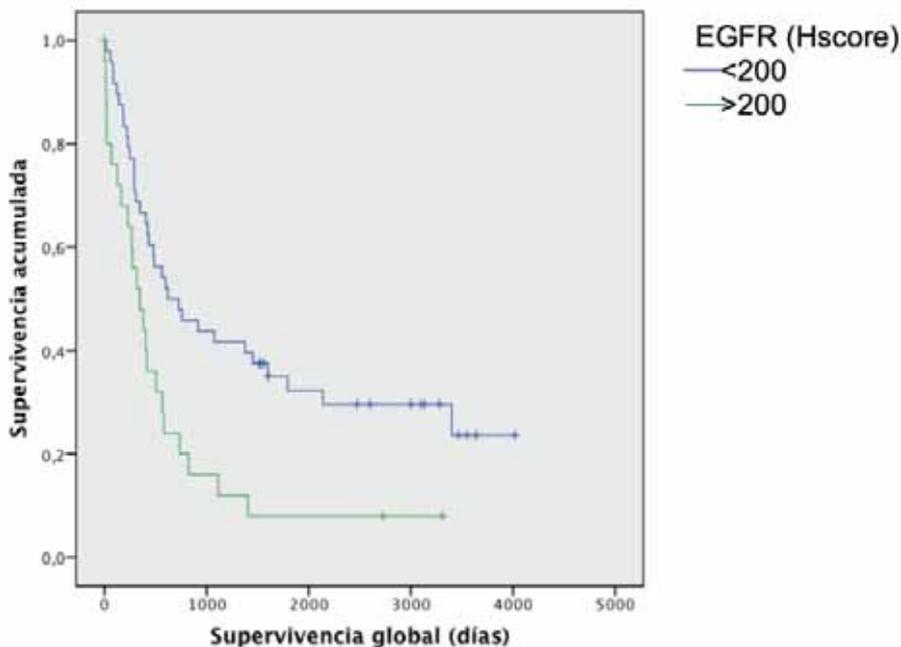


Figura 5.8. Curvas de supervivencia (Kaplan Meier) en los casos de AID, en función de niveles de expresión de EGFR (Hscore mayor o menor de 200). Diferencias significativas entre ambos grupos (p=0,005).

V.2.b. PTEN

La expresión de PTEN se limitaba a membrana y citoplasma, sin expresión nuclear. Tanto las células tumorales como las neuronas y células endoteliales mostraron dicha expresión (que se consideró control interno positivo de la técnica). Aunque no se halló una correlación estadísticamente significativa entre la expresión de esta proteína y el grado histológico del AID, se encontró una expresión significativamente mayor en situación tumoral que en situación reactiva (tabla 5.3, figura 5.9). El 11,1% de los AD, 26,7% de AA y 16,9% de los GBM mostraron una expresión de PTEN inferior o igual a 10/300. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

	PTEN	
	Mediana	IC [5-95%]
Gliosis	0	0-15
AD	60	10-110
AA	40	0-166
GBM	105	0-260

Tabla 5.3. Valores de Hscore de PTEN en los casos de gliosis, astrocitomas difusos, astrocitomas anaplásicos y glioblastomas

RESULTADOS

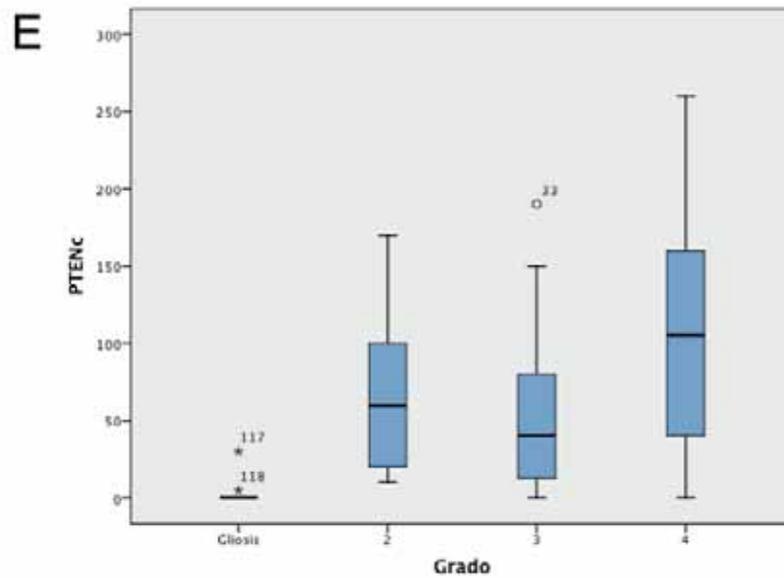
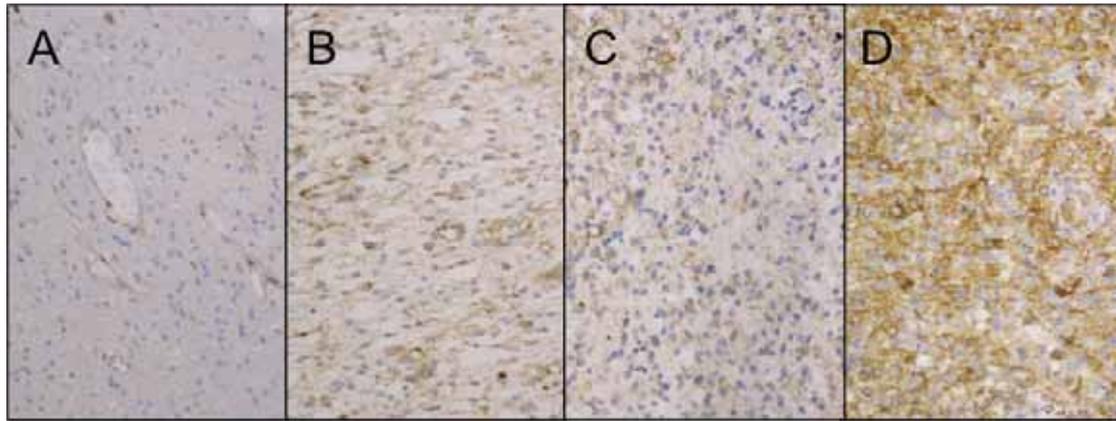


Figura 5.9. Expresión de PTEN en gliosis (A), astrocitomas difusos (B), astrocitomas anaplásicos (C) y GBM (D), 200x. Diagrama de cajas comparando los niveles de expresión en los distintos grados histológicos (E).

En cuanto al impacto de la valoración de PTEN en el diagnóstico, no fue de utilidad en el diagnóstico de AID de alto grado frente a bajo grado (p-valor no significativo), pero sí en el diagnóstico de GBM frente a AID de menor grado, con baja sensibilidad (50,8%, tabla 5.4). No se encontraron diferencias significativas de supervivencia entre los grupos con mayor o menor PTEN (fig. 5.10).

PTEN		
	Alto grado vs bajo grado	GBM vs otro grado
Punto de corte Hscore	100	100
Sensibilidad (%)	44,6	50,8
Especificidad (%)	77,8	79,2
VPP (%)	94,3	85,7
VPN (%)	14,6	39,6
p-valor	ns	0,012

IMPACTO SUPERVIVENCIA

Global, p-valor	ns
------------------------	----

Tabla 5.4. Puntos de corte de Hscore de PTEN con mejor sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de AID de bajo grado frente a alto grado (columna de la izquierda) y de GBM frente al resto de AID (columna de la derecha), con sus respectivos parámetros estadísticos. Diferencias no significativas.

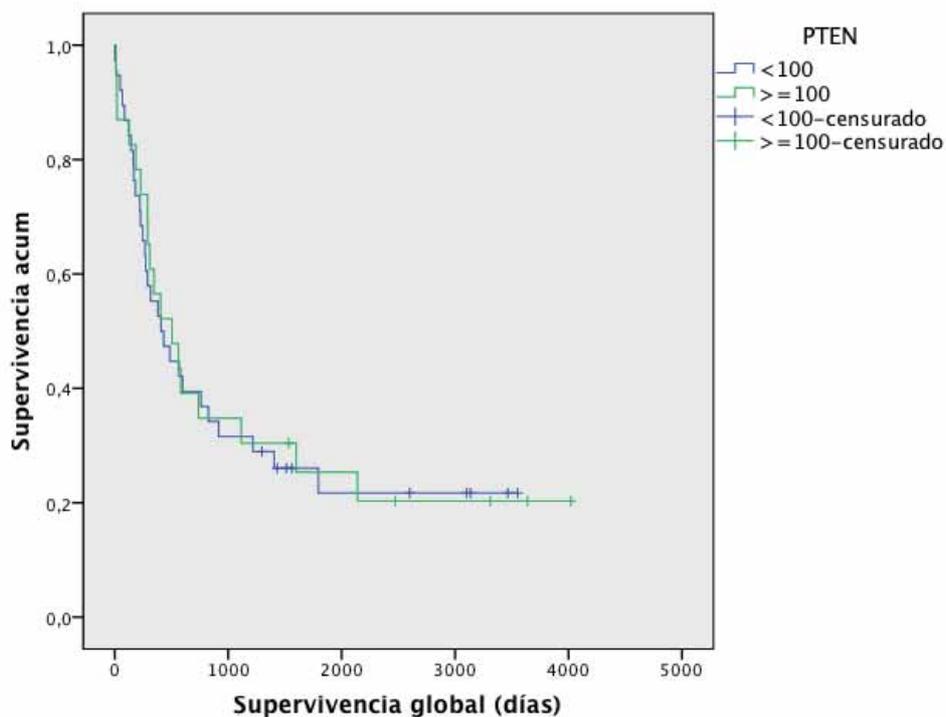


Figura 5.10. Curvas de supervivencia (Kaplan Meier) en los casos de AID, en función de niveles de expresión de PTEN (Hscore mayor o menor de 100). Diferencias no significativas.

V.2.c. pMAPK

Se encontró expresión parcheada de pMAPK en núcleos de células endoteliales, y en células tumorales, en núcleo y citoplasma, sin encontrar correlación con el grado

RESULTADOS

tumoral de la lesión (fig. 5.11). No se encontraron diferencias significativas en la expresión nuclear de pMAPK entre los casos de gliosis y los de AID (fig. 5.11, tabla 5.5), pero sí en la expresión citoplasmática (fig. 5.11, tabla 5.6). A nivel global, la expresión citoplasmática de pMAPK es mayor en los casos de gliosis que en el grupo tumoral ($p=0,003$). Las diferencias también son significativas entre el grupo de gliosis y la expresión citoplasmática de pMAPK en GBM ($p=0,003$), pero no con los AD y los AA (fig. 5.11).

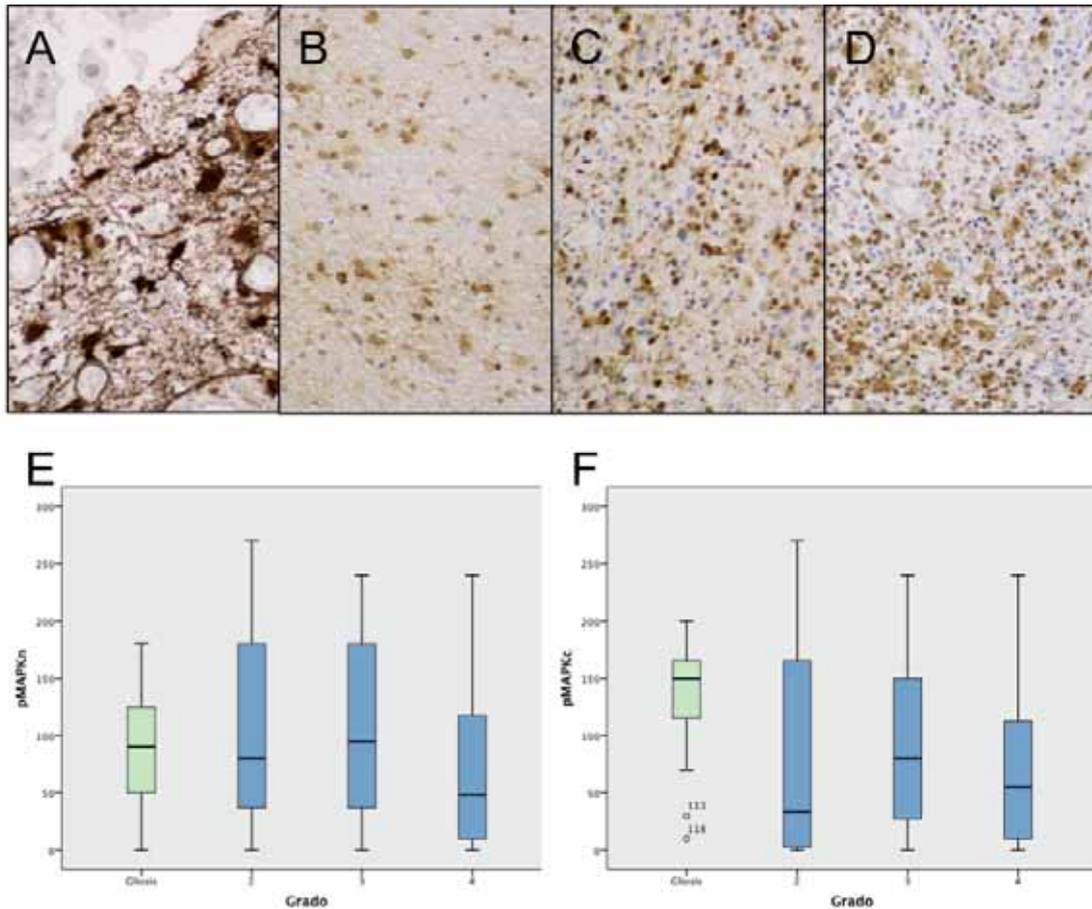


Figura 5.11. Expresión de pMAPK en gliosis (A), astrocitomas difusos (B), astrocitomas anaplásicos (C) y glioblastomas (D), 200x. Diagrama de cajas comparando los niveles de expresión en los distintos grados histológicos, nuclear (E) y citoplasmática (F). Diferencias entre grado no significativas.

pMAPK nuclear		
	Mediana	IC [5-95%]
Gliosis	90	0-168
AD	80	0-180
AA	95	0-240
GBM	48,5	0-202

Tabla 5.5. Valores de Hscore de pMAPK nuclear en los casos de gliosis, astrocitomas difusos, astrocitomas anaplásicos y glioblastomas.

pMAPK citoplasmática		
	Mediana	IC [5-95%]
Gliosis	150	0-188
AD	33	0-187
AA	80	0-213
GBM	55	0-202

Tabla 5.6. Valores de Hscore de pMAPK citoplasmática en los casos de gliosis, astrocitomas difusos, astrocitomas anaplásicos y glioblastomas.

En cuanto al impacto de la valoración de pMAPK en el diagnóstico, ni la valoración de tinción nuclear, ni la de citoplasmática ayudaron en el diagnóstico diferencial entre tumores de alto y bajo grado, y en diferenciar GBM del resto de AID (tablas 5.7 y 5.8). Los mejores puntos de corte hallados para diagnóstico no separan grupos con diferencias pronósticas (tablas 5.7 y 5.8, figs. 5.12 y 5.13).

pMAPK nuclear		
	Alto grado vs bajo grado	GBM vs otro grado
Punto de corte Hscore	95	15
Sensibilidad (%)	37,9	68,8
Especificidad (%)	66,7	19
VPP (%)	89,3	49,3
VPN (%)	12,8	34,8
p-valor	ns	ns
IMPACTO SUPERVIVENCIA		
Global, p-valor	ns	

Tabla 5.7. Puntos de corte de Hscore de pMAPK nuclear con mejor sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de AID de bajo grado frente a alto grado (columna de la izquierda) y de GBM frente al resto de AID (columna de la derecha), con sus respectivos parámetros estadísticos y su impacto en supervivencia.

RESULTADOS

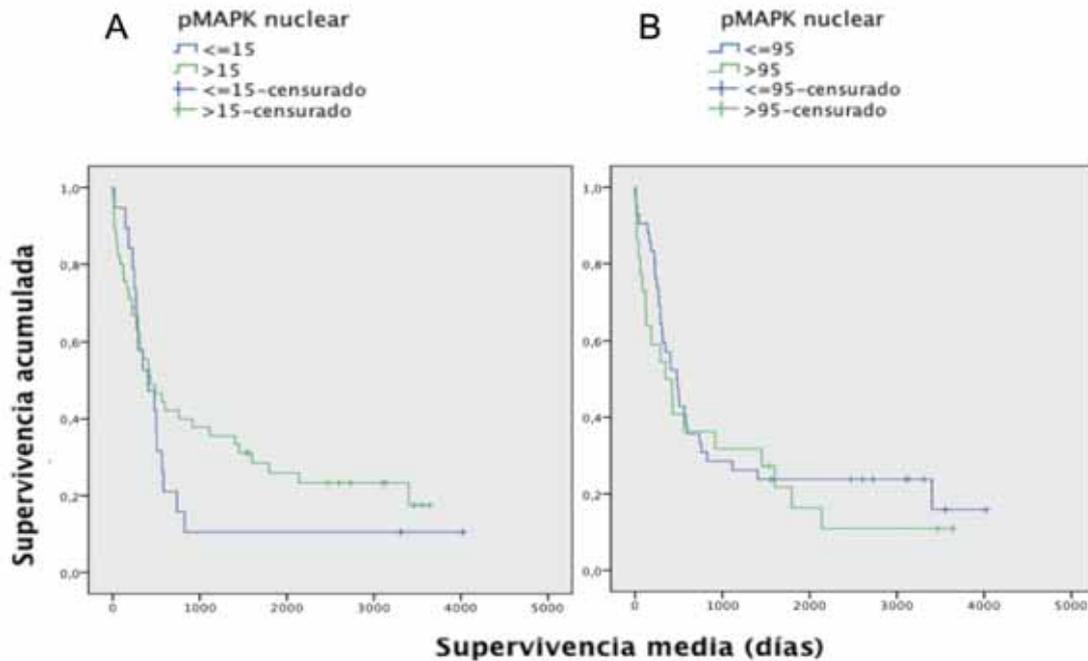


Figura 5.12. Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) en función de los niveles de pMAPK en núcleo, punto de corte de 15 (A) y punto de corte de 95 (B). Diferencias no significativas.

pMAPK citoplasmática		
	Alto grado vs bajo grado	GBM vs otro grado
Punto de corte Hscore	37	28
Sensibilidad (%)	54,5	64,6
Especificidad (%)	62,5	24,4
VPP (%)	92,3	50
VPN (%)	14,3	37
p-valor	ns	ns
IMPACTO SUPERVIVENCIA		
Global, p-valor	ns	

Tabla 5.8. Puntos de corte de Hscore de pMAPK citoplasmática con mejor sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de AID de bajo grado frente a alto grado (columna de la izquierda) y de GBM frente al resto de AID (columna de la derecha), con sus respectivos parámetros estadísticos y su impacto en supervivencia.

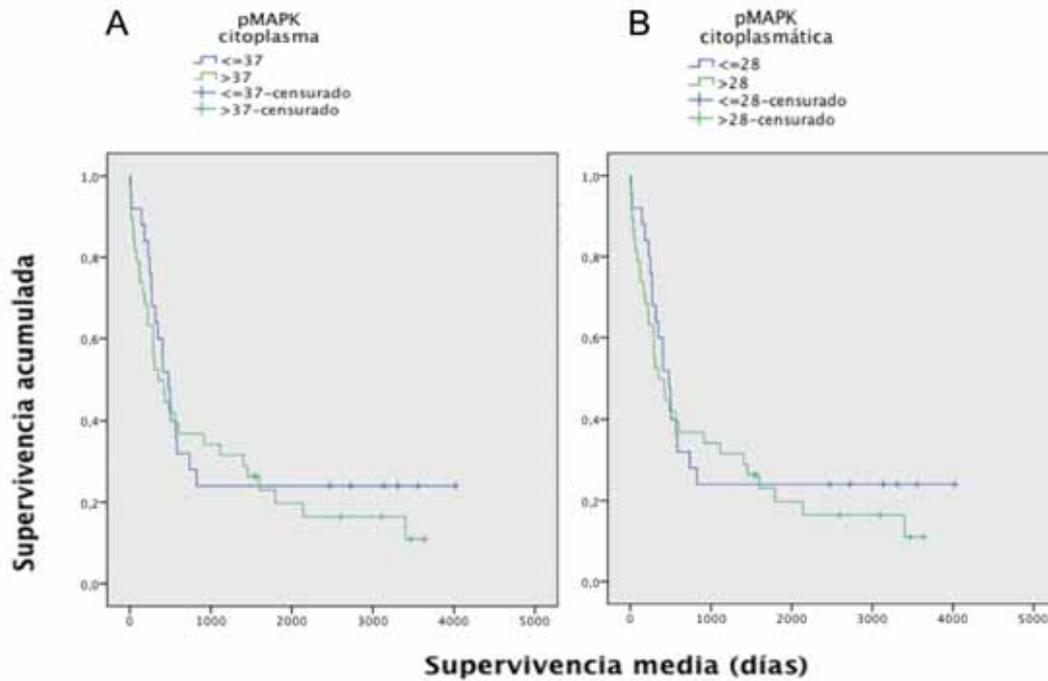


Figura 5.13. Cuervas de supervivencia (Kaplan-Meier) en función de los niveles de pMAPK en citoplasma, punto de corte de 37 (A) y punto de corte de 28 (B). Diferencias no significativas.

V.2.d. p4E-BP1

Se encontró expresión interna de p4E-BP1 en células endoteliales y citoplasmas neuronales, y en citoplasmas de células tumorales, con expresión nuclear en menor proporción. Se encontró correlación entre la expresión de esta proteína y el grado tumoral ($p < 0,001$) y diferencias significativas entre situación tumoral (mayor) frente a los casos de gliosis ($p < 0,001$, tabla 5.9, fig. 5.14).

	p4E-BP1	
	Mediana	IC [5-95%]
Gliosis	5	0-22
AD	80	0-186
AA	120	21-219
GBM	165	32-275

Tabla 5.9. Valores de Hscore de p4E-BP1 en los casos de gliosis, astrocitomas difusos, astrocitomas anaplásicos y glioblastomas.

RESULTADOS

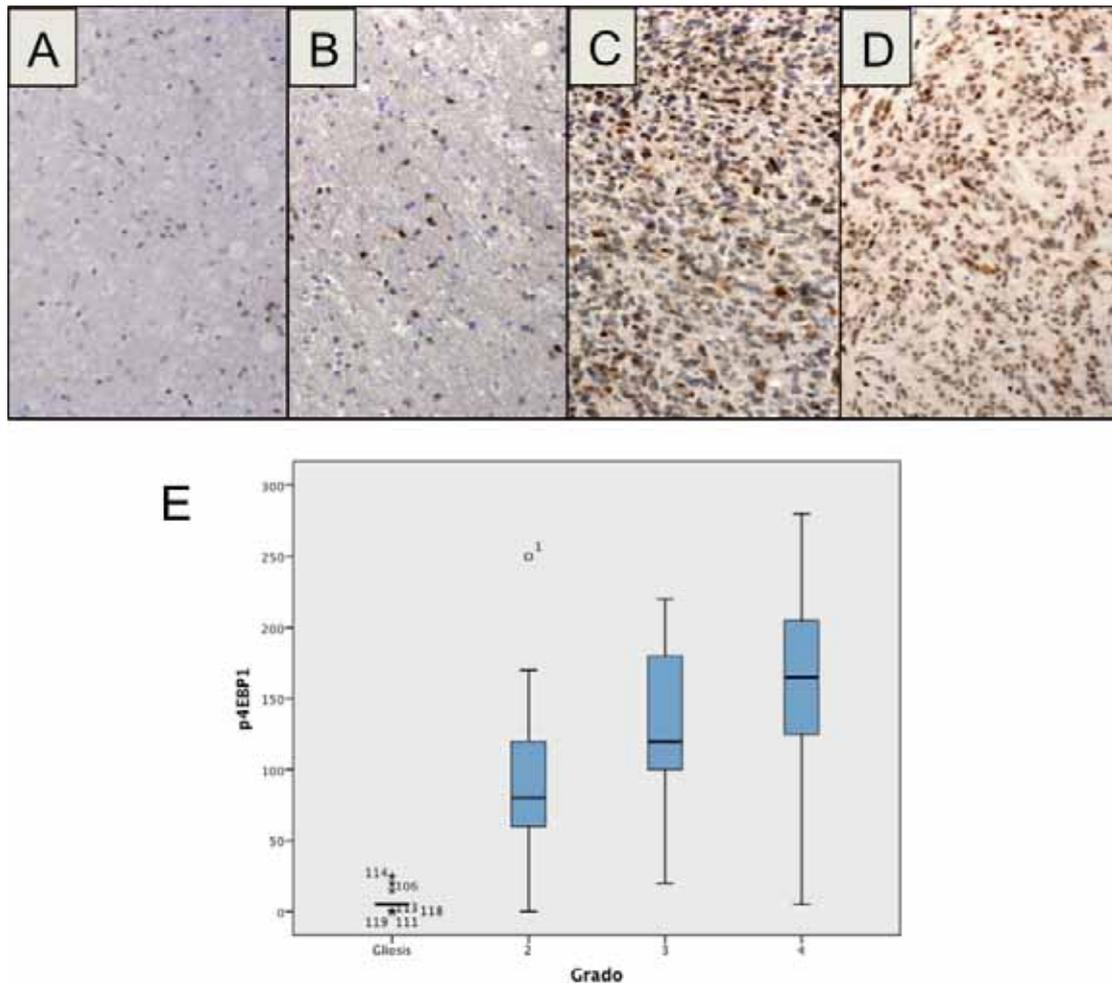


Fig. 5.14. Expresión de p4E-BP1 en gliosis (A), astrocitoma difuso (B), astrocitoma anaplásico (C) y GBM (D), 200x. Diagrama de cajas mostrando las diferencias en niveles de expresión ($p < 0,001$). Expresión parcheada de p4E-BP1 en células endoteliales que sirve de control interno.

En cuanto al impacto de la valoración de p4E-BP1 en el diagnóstico (tabla 5.10), se encontraron puntos de corte que señalaban diferencias significativas entre grupos, con mejor sensibilidad (72,9%) diferenciando GBM de astrocitomas de otros grados. No se encontraron diferencias significativas de supervivencia entre los grupos con mayor o menor p4E-BP1 (tabla 5.10, fig. 5.15).

p4E-BP1		
	Alto grado vs bajo grado	GBM vs otro grado
Punto de corte Hscore	130	130
Sensibilidad (%)	63,8	72,9
Especificidad (%)	88,2	71,1
VPP (%)	95,7	76,1
VPN (%)	37,5	67,5
p-valor	<0,001	<0,001
IMPACTO SUPERVIVENCIA		
Global, p-valor	ns	

Tabla 5.10. Puntos de corte de Hscore de p4E-BP1 con mejor sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de AID de bajo grado frente a alto grado (columna de la izquierda) y de GBM frente al resto de AID (columna de la derecha), con sus respectivos parámetros estadísticos y su impacto en supervivencia.

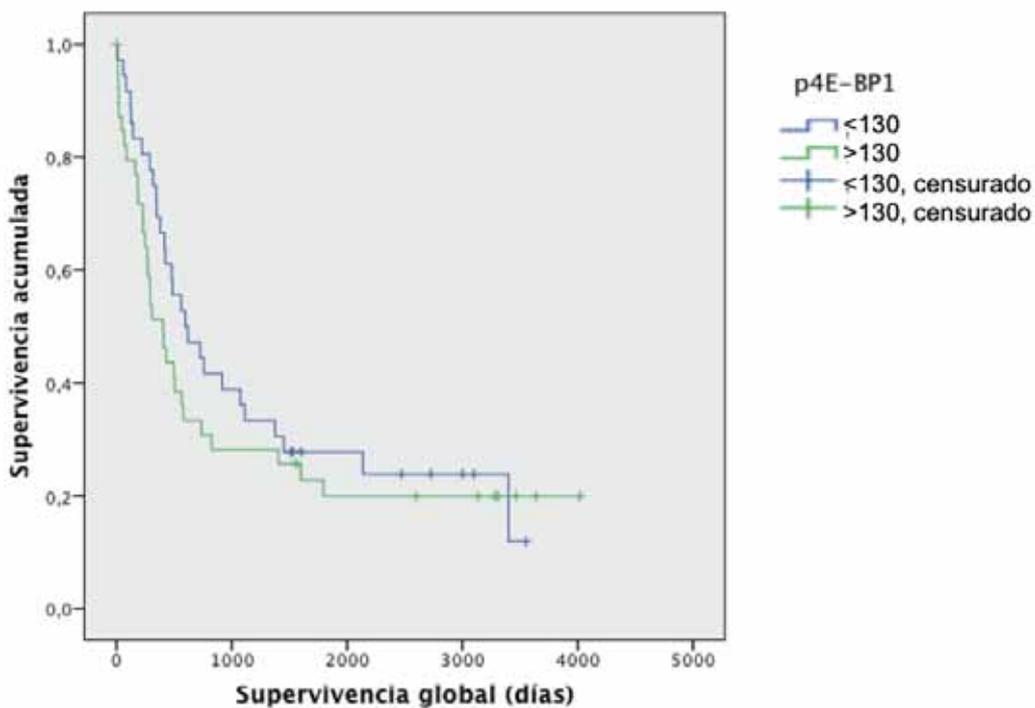


Figura 5.15. Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) en función de la expresión de p4E-BP1 (punto de corte de 130). Diferencias no significativas.

RESULTADOS

V.2.e. 4E-BP1

La expresión de la forma total de 4E-BP1 se encontró en endotelios y principalmente en citoplasmas de células tumorales, con un aumento que se correlacionaba con grado tumoral ($p < 0,001$, tabla 5.11, fig. 5.16). La expresión de 4E-BP1 total es significativamente mayor en situación tumoral respecto a los casos de gliosis ($p < 0,001$). Esta significancia estadística se pierde únicamente si comparamos la expresión de 4E-BP1 total de los casos de gliosis con los AD (p no significativa).

4E-BP1		
	Mediana	IC [5-95%]
Gliosis	20	5-48
AD	40	0-128
AA	70	1-168
GBM	97	9-200

Tabla 5.11. Valores de Hscore de 4E-BP1 en los casos de gliosis, astrocitomas difusos, astrocitomas anaplásicos y glioblastomas.

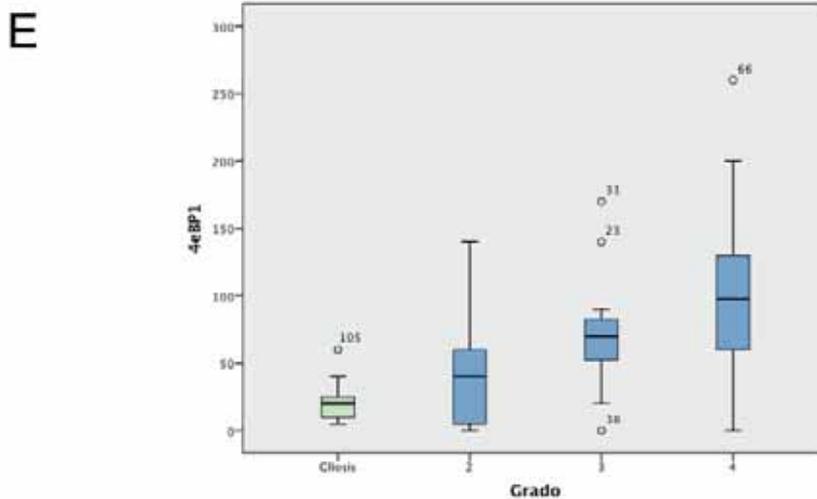
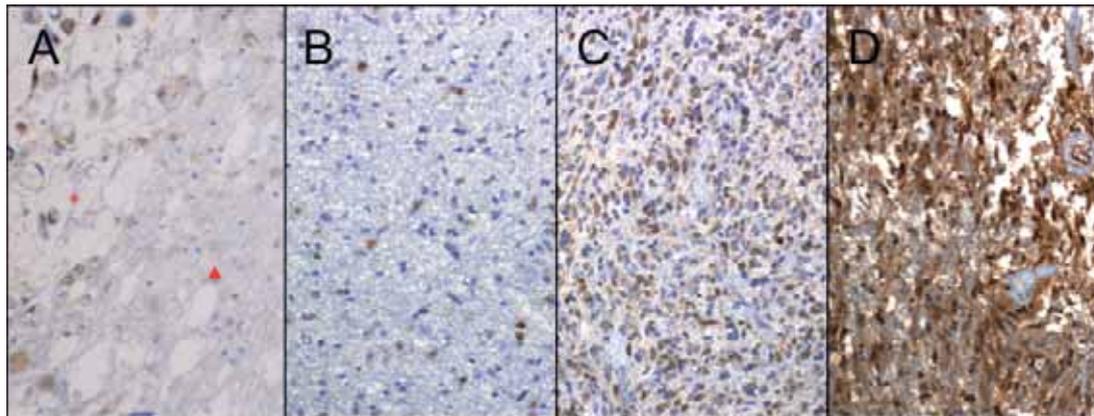


Figura. 5.16. Expresión de 4E-BP1 total en situación de gliosis (A, asterisco rojo en la lesión metastásica, triángulo en la gliosis peritumoral), astrocitomas difusos (B), astrocitomas anaplásicos (C) y GBM (D), 200x. Diagrama de cajas comparando los niveles de expresión en los distintos grados histológicos (E), con diferencias significativas.

En cuanto al impacto de la valoración de 4E-BP1 en el diagnóstico (tabla 5.12), se encontraron puntos de corte que señalaban diferencias significativas entre grupos, con mejor sensibilidad (70,5%) diferenciando astrocitomas de alto grado y de bajo grado que en el diagnóstico de GBM (60,3%), con un elevado valor predictivo positivo (94,8%). No se encontraron diferencias significativas de supervivencia entre los grupos con mayor o menor p4E-BP1 (tabla 5.12, fig. 5.17).

4E-BP1		
	Alto grado vs bajo grado	GBM vs otro grado
Punto de corte Hscore	65	85
Sensibilidad (%)	70,5	60,3
Especificidad (%)	82,4	81,1
VPP (%)	94,8	83,3
VPN (%)	37,8	56,6
p-valor	<0,001	<0,001
IMPACTO SUPERVIVENCIA		
Global, p-valor	ns	ns

Tabla 5.12. Puntos de corte de Hscore de 4E-BP1 con mejor sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de AID de bajo grado frente a alto grado (columna de la izquierda) y de GBM frente al resto de AID (columna de la derecha), con sus respectivos parámetros estadísticos y su impacto en supervivencia.

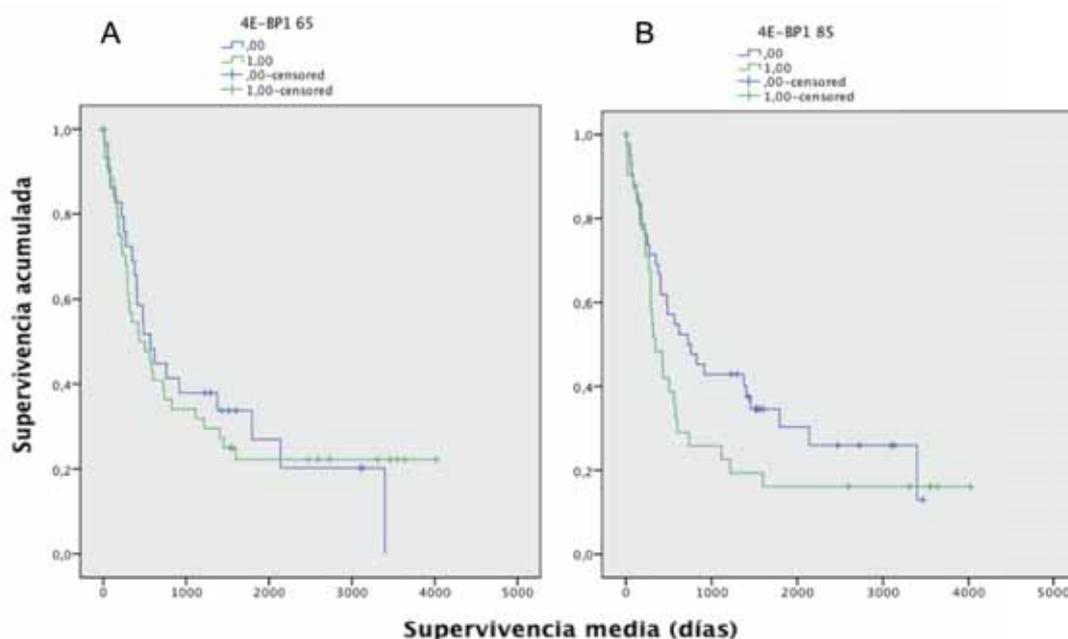


Figura 5.17. Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) en función de la expresión de 4E-BP1; punto de corte: Hscore de 65 (A) y de 85 (B). Diferencias no estadísticas.

RESULTADOS

V.2.f. *peIF4E*

Encontramos como control interno de la forma fosforilada de eIF4E, expresión en células endoteliales, y en células tumorales expresión en citoplasmas, con diferencias significativas entre los distintos grados histológicos y respecto a los casos de gliosis ($p < 0,001$, tabla 5.13, fig. 5.18).

peIF4E		
	Mediana	IC [5-95%]
Gliosis	30	10-88
AD	5	0-112
AA	10	0-128
GBM	100	33-193

Tabla 5.13. Valores de Hscore de *peIF4E* en los casos de gliosis, astrocitomas difusos, astrocitomas anaplásicos y glioblastomas.

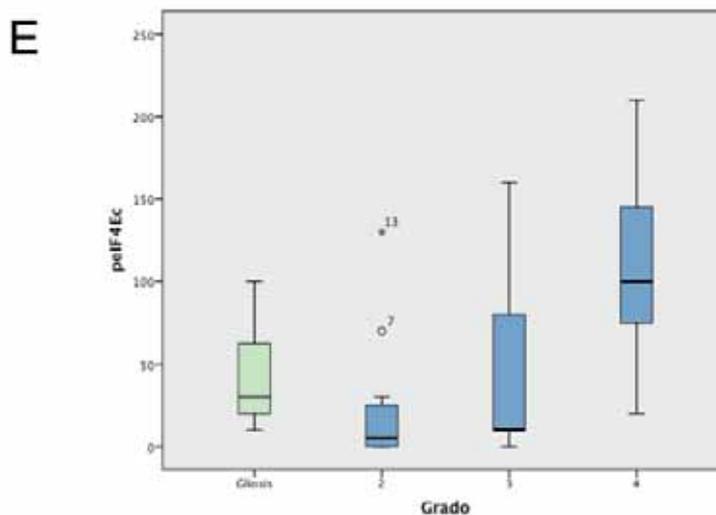
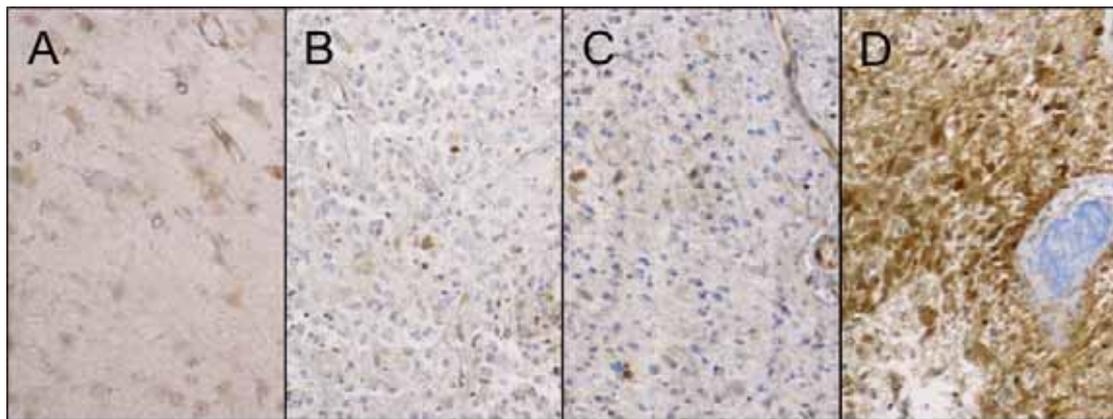


Figura. 5.18. Expresión de *peIF4E* en situación de gliosis (A), astrocitomas difusos (B), astrocitomas anaplásicos (C) y GBM (D), 200x. Expresión parcheada en células endoteliales como control interno. Diagrama de cajas comparando los niveles de expresión en los distintos grados histológicos (E), con diferencias significativas.

En cuanto al impacto de la valoración de pelf4E en el diagnóstico (tabla 5.14), se encontraron puntos de corte que señalaban diferencias significativas entre grupos, con mejor sensibilidad en el diagnóstico de GBM (94,3%) que diferenciando astrocitomas de alto grado y de bajo grado (81,4%), con un elevado valor predictivo positivo en ambas situaciones (96,6% en alto vs bajo grado, y 87,7% en GBM vs otros grados). pelf4E tiene además impacto significativo sobre la supervivencia (tabla 5.14, fig. 5.19), incluso al estratificar por grupos (fig. 5.20).

El análisis multivariante mediante modelo de regresión de Cox demuestra que **pelf4E es el único marcador predictor independiente de supervivencia.**

pelf4E		
	Alto grado vs bajo grado	GBM vs otro grado
Punto de corte Hscore	30	40
Sensibilidad (%)	81,4	94,3
Especificidad (%)	83,3	75,9
VPP (%)	96,6	87,7
VPN (%)	43,5	88
p-valor	<0,001	<0,001
IMPACTO SUPERVIVENCIA		
Global, p-valor	<0,001	<0,001
Global, días (media)	2472 vs 629	2297 vs 647
Por grado, p-valor	0,043	ns

Tabla 5.14. Puntos de corte de Hscore de pelf4E con mejor sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de AID de bajo grado frente a alto grado (columna de la izquierda) y de GBM frente al resto de AID (columna de la derecha), con sus respectivos parámetros estadísticos y su impacto en supervivencia.

RESULTADOS

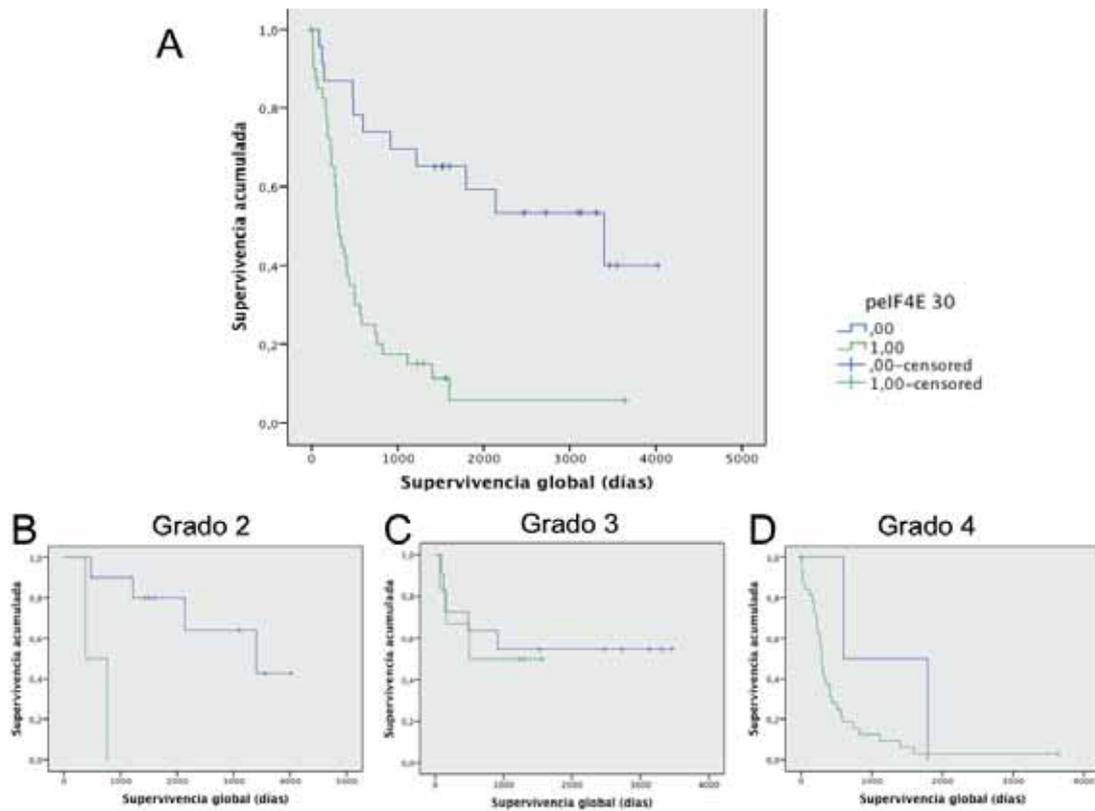


Figura 5.19. Curvas de supervivencia en función de la expresión de pelf4E, punto de corte en 30, en el conjunto de AID (A), en grado 2 (B), astrocitomas anaplásicos (C) y GBM (D). Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$ en A, $p = 0,043$ en B-D).

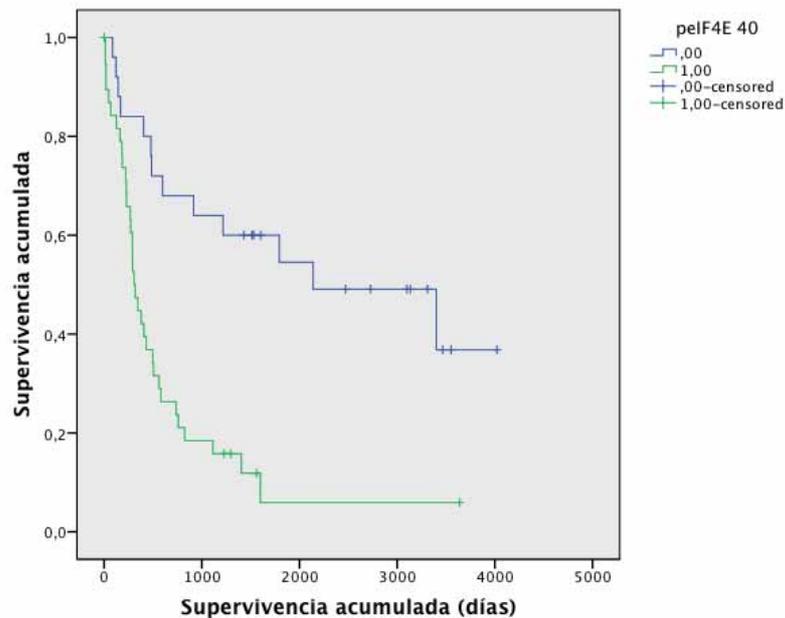


Figura 5.20. Curvas de supervivencia en función de la expresión de pelf4E, punto de corte de 40. Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$).

V.2.g. eIF4E

La expresión de eIF4E se encontraba de manera predominante en membrana y citoplasma. Tanto las células tumorales como las neuronas y células endoteliales mostraron dicha expresión (que se consideró como control interno positivo de la tinción). Se encontró correlación estadísticamente significativa con grado tumoral ($p < 0,001$, tabla 5.15, fig. 5.21).

eIF4E		
	Mediana	IC [5-95%]
Gliosis	0	0-60
AD	0	0-39
AA	30	0-158
GBM	75	0-185

Tabla 5.15. Valores de Hscore de eIF4E en los casos de gliosis, astrocitomas difusos, astrocitomas anaplásicos y glioblastomas.

La expresión de eIF4E total y de su forma fosforilada son significativamente mayores de manera global en situación tumoral frente a los casos de gliosis, con la siguiente potencia estadística:

	Gliosis vs AD	Gliosis vs AA	Gliosis vs GBM	Gliosis vs AID
eIF4E	ns	0,036	<0,001	<0,001
peIF4E	0,032	ns	<0,001	0,022

Tabla 5.16. Comparación de Hscore de eIF4E y peIF4E en situación de gliosis frente a los distintos grados histológicos, y frente al grupo de AID (p-valor).

Aunque encontramos diferencias estadísticamente significativas comparando la situación tumoral frente a la no tumoral, éstas dejan de ser significativas cuando comparamos la expresión de eIF4E total entre los casos de gliosis y los AD, y la de peIF4E entre los casos de gliosis y los AA. De hecho, los niveles de expresión de peIF4E en situación de gliosis superan los encontrados en AD (fig. 5.21).

En los casos de gliosis encontramos diferencias entre el grupo de gliosis alrededor de malformaciones arteriovenosas (media de 3,8/300) y el grupo de gliosis alrededor de metástasis (media de 33,3/300), sin alcanzar la significancia estadística ($p = 0,066$, fig. 5.22).

RESULTADOS

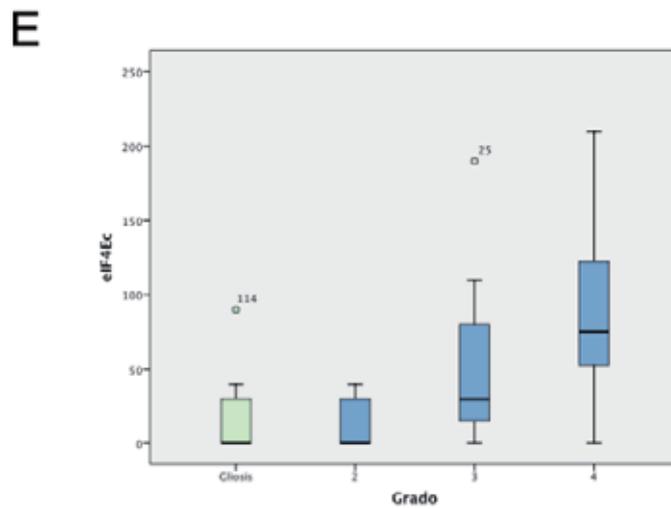
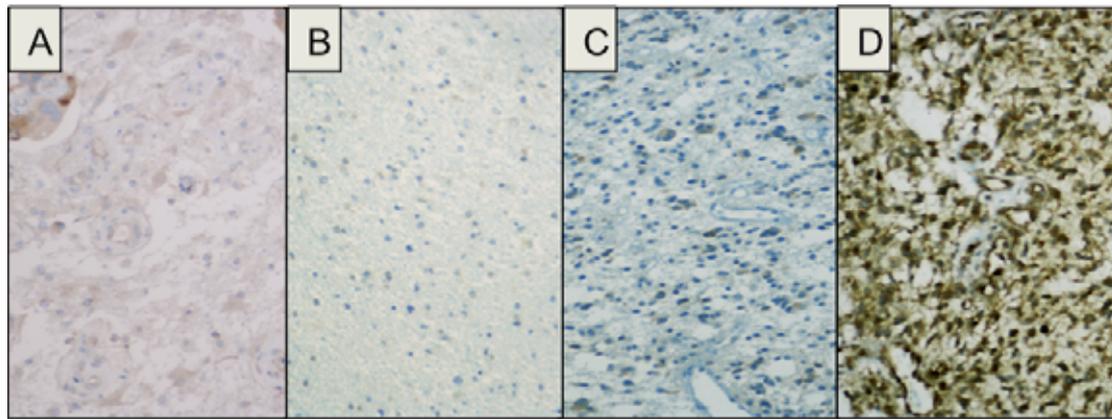
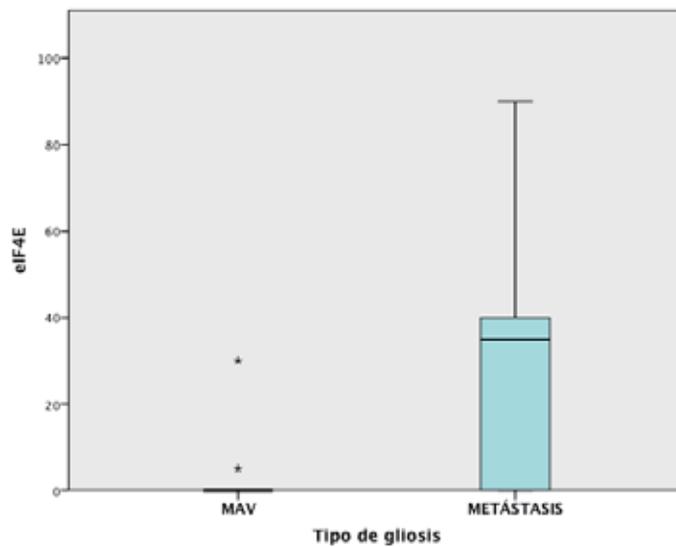


Figura. 5.21. Expresión de eIF4E total en situación de gliosis (A, nido metastásico con expresión de proteína), astrocitomas difusos (B), astrocitomas anaplásicos (C) y GBM (D), 200x. Diagrama de cajas comparando los niveles de expresión en los distintos grados histológicos (D), con diferencias significativas.

Figura 5.22. Comparación de niveles de eIF4E en los casos de gliosis alrededor de MAV y alrededor de metástasis ($p=0,066$).



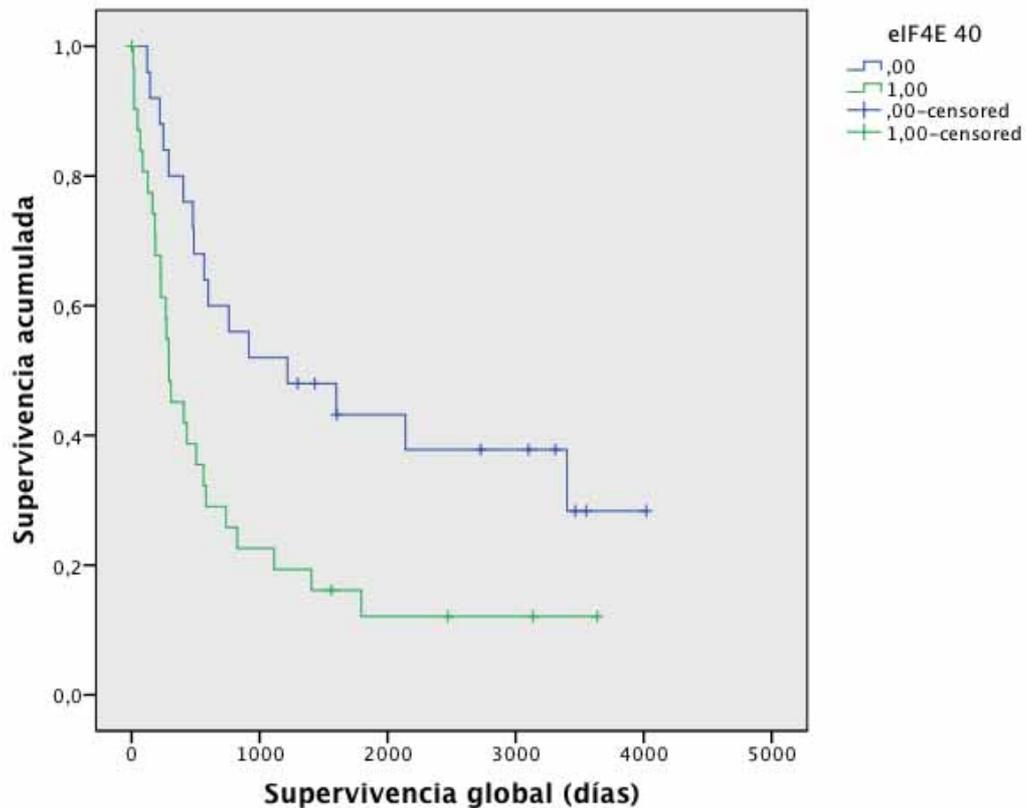
En lo que respecta al valor diagnóstico del Hscore de eIF4E, encontramos un mismo punto de corte con mejor sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de AID de alto grado frente a AID de bajo grado, y el diagnóstico de GBM frente a AID de otro grado (tabla 5.17). En la primera situación, el VPP del eIF4E alcanza el 100%.

Esta proteína tiene además impacto en el pronóstico del paciente, con diferencias significativas de supervivencia entre los que superan el punto de corte (supervivencia media de 814 días) frente a los que no lo superan (supervivencia media de 1911 días, $p=0,006$, tabla 5.17, fig. 5.23). Esto es cierto teniendo en cuenta a toda la población, de manera global, pero las diferencias se pierden al estratificar por grados.

eIF4E		
	Alto grado vs bajo grado	GBM vs otro grado
Punto de corte Hscore	40	40
Sensibilidad (%)	72,1	81,3
Especificidad (%)	100	78,3
VPP (%)	100	88,6
VPN (%)	37	66,7
p-valor	<0,001	<0,001
IMPACTO SUPERVIVENCIA		
Global, p-valor	0,006	
Global, días	1911 si eIF4E<40, 814 si >40	
Por grado, p-valor	ns	

Tabla 5.17. Puntos de corte de Hscore de eIF4E con mejor sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de AID de bajo grado frente a alto grado (columna de la izquierda) y de GBM frente al resto de AID (columna de la derecha), con sus respectivos parámetros estadísticos y su impacto en supervivencia.

RESULTADOS



V.2.h. pS6

Se observó expresión en células endoteliales que se tuvo en cuenta como control interno. En células tumorales la expresión se encontró principalmente en citoplasma. Los casos de gliosis mostraron unos niveles de pS6 similares a las situaciones tumorales, sin diferencias significativas entre grupo tumoral frente a no tumoral, ni entre los diferentes grados de malignidad (tabla 5.18, fig. 5.24).

	pS6	
	Mediana	IC [5-95%]
Gliosis	120	30-168
AD	65	5-231
AA	42	0-154
GBM	92	18-243

Tabla 5.18. Valores de Hscore de pS6 en los casos de gliosis, astrocitomas difusos, astrocitomas anaplásicos y glioblastomas.

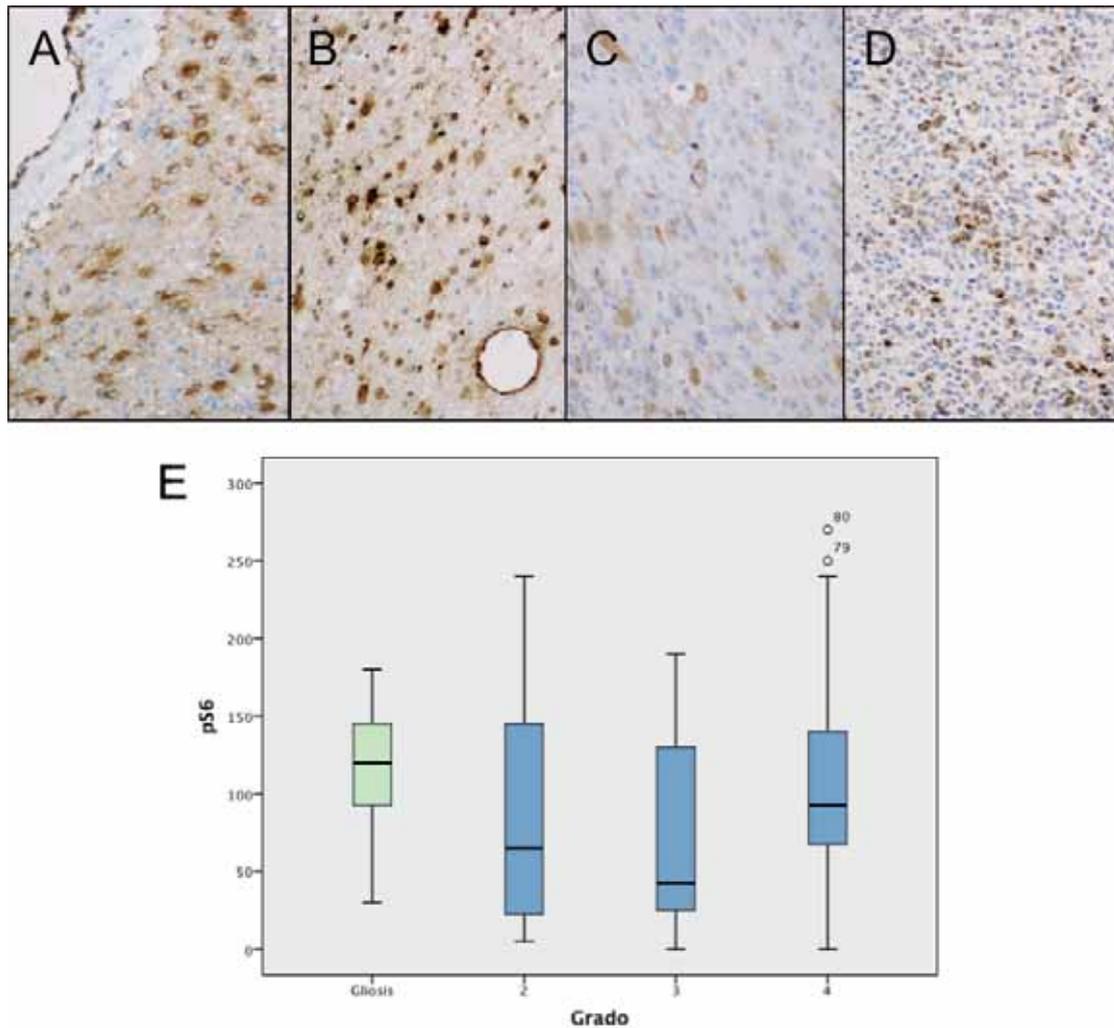


Figura. 5.24. Expresión de pS6 en situación de gliosis (A, pared de vaso de malformación arteriovenosa con expresión de proteína en células endoteliales), astrocitomas difusos (B), astrocitomas anaplásicos (C) y GBM (D), 200x. Expresión parcheada en células endoteliales como control interno. Diagrama de cajas comparando los niveles de expresión en los distintos grados histológicos (E).

En cuanto a la ayuda de pS6 en el diagnóstico de los AID, tras encontrar el punto con mejor sensibilidad y especificidad para separar AID de alto y bajo grado, y GBM del resto de AID, se vio que las diferencias entre grupos no eran reales (p -valor de 0,163 y 0,076, tabla 5.19).

Tampoco se encontró impacto de la proteína pS6 en la supervivencia de nuestra serie (tabla 5.19, fig. 5.25).

RESULTADOS

pS6		
	Alto grado vs bajo grado	GBM vs otro grado
Punto de corte	65	65
Sensibilidad (%)	67	75
Especificidad (%)	45	55,2
VPP (%)	90,4	75
VPN (%)	20,7	55,2
p-valor	0,163	0,076

IMPACTO SUPERVIVENCIA	
Global, p-valor	ns

Tabla 5.19. Puntos de corte de Hscore de pS6 con mejor sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de AID de bajo grado frente a alto grado (columna de la izquierda) y de GBM frente al resto de AID (columna de la derecha), con sus respectivos parámetros estadísticos y su impacto en supervivencia.

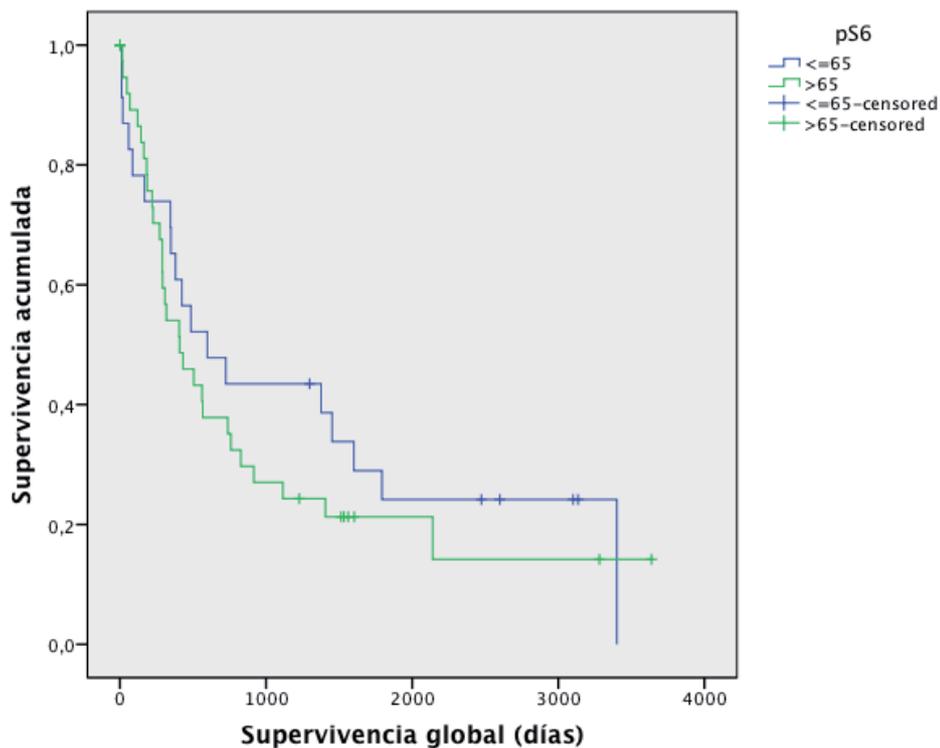


Figura 5.25. Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) en función de la expresión de pS6 (punto de corte de 65). Diferencias no significativas.

V.2.i. Ciclina D1

La localización de la expresión de ciclina D1 es nuclear, el control interno de la técnica fue la expresión en células endoteliales. El porcentaje de expresión de

ciclina D1 es mayor en el grupo de AID ($p=0,004$), y GBM ($p<0,001$) y AA ($p=0,039$) frente a situaciones de gliosis (tabla 5.20, fig. 5.26). Sin embargo, no existe una diferencia significativa en la expresión de ciclina D1 entre la gliosis y el astrocitoma difuso de bajo grado (AD). Se encontraron diferencias significativas entre la expresión de ciclina D1 en AD y AID de alto grado ($p= 0,001$).

Ciclina D1		
	Mediana	IC [5-95%]
Gliosis	5	0-28
AD	5	0-20
AA	15	0-48
GBM	15	2-40

Tabla 5.20. Porcentaje de expresión de Ciclina D1 en los casos de gliosis, astrocitomas difusos, astrocitomas anaplásicos y glioblastomas.

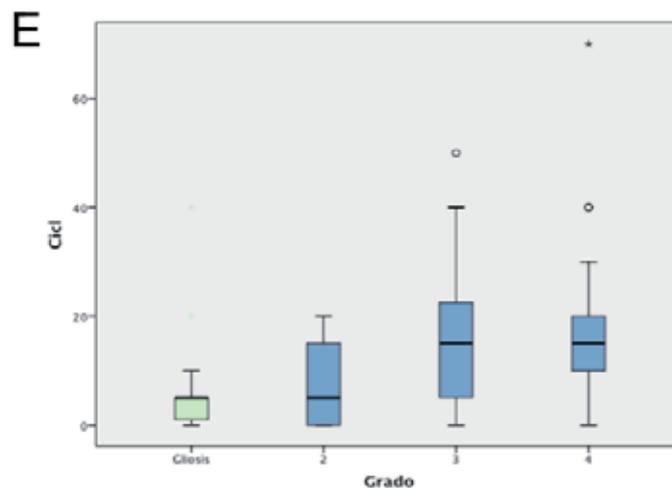
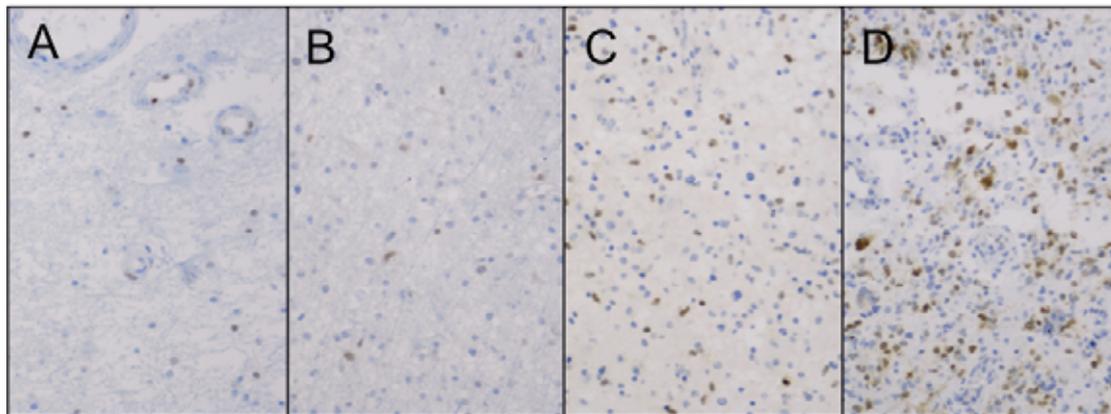


Figura. 5.26 Expresión de ciclina D1 en situación de gliosis (A), astrocitomas difusos (B), astrocitomas anaplásicos (C) y GBM (D), 200x. Expresión parcheada de proteína en células endoteliales como control interno. Diagrama de cajas comparando los niveles de expresión en los distintos grados histológicos (E), con diferencias significativas.

RESULTADOS

En cuanto al impacto de ciclina D1 en el diagnóstico, se encontró un mismo punto de corte, con valor estadístico, con mejor sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de AID de alto grado frente a AID de bajo grado, y en el diagnóstico de GBM frente a otros AID (tabla 5.21). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre la supervivencia de los grupos obtenidos a partir de estos puntos de corte (tabla 5.21, fig. 5.27).

Ciclina D1		
	Alto grado vs bajo grado	GBM vs otro grado
Punto de corte (%)	2	2
Sensibilidad (%)	92,5	94,7
Especificidad (%)	44,4	26,8
VPP (%)	88,1	64,3
VPN (%)	57,1	78,6
p-valor	<0,001	<0,001
IMPACTO SUPERVIVENCIA		
Global, p-valor	ns	

Tabla 5.21. Puntos de corte de porcentaje de expresión de ciclina D1 con mejor sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de AID de bajo grado frente a alto grado (columna de la izquierda) y de GBM frente al resto de AID (columna de la derecha), con sus respectivos parámetros estadísticos y su impacto en supervivencia.

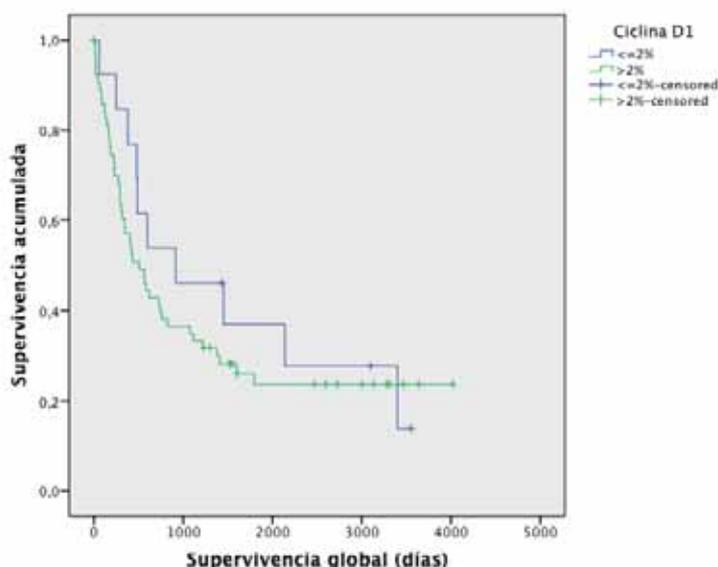


Figura 5.27. Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) en función de la expresión de ciclina D1 (punto de corte de 2%). Diferencias no significativas.

V.2.j. Ki67

Sólo se consideró la tinción nuclear de este anticuerpo en el cálculo del porcentaje de células que proliferaban. El índice de proliferación tumoral aumentaba con el grado tumoral ($p < 0,001$, tabla 5.22, fig. 5.28), y era significativamente mayor que en condiciones de reactividad ($p < 0,001$).

Ki67		
	Mediana	IC [5-95%]
Gliosis	1	0-3
AD	7	1-15
AA	15	2-47
GBM	25	6-76

Tabla 5.22. Porcentaje de expresión de Ki67 en los casos de gliosis, astrocitomas difusos, astrocitomas anaplásicos y glioblastomas.

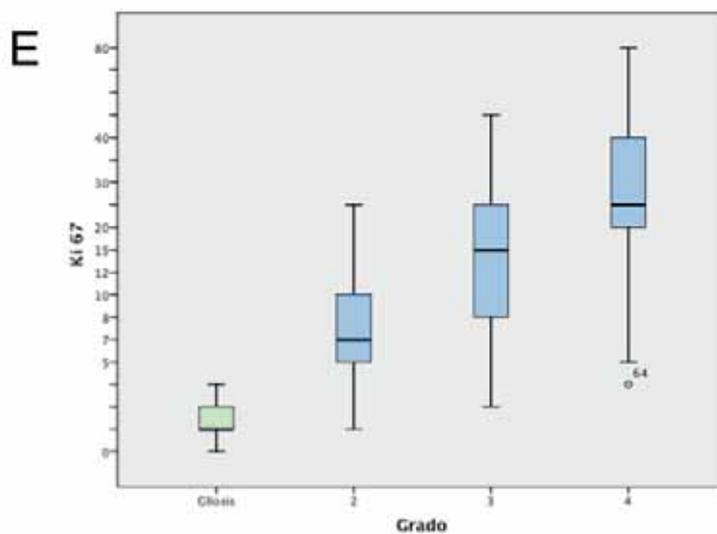
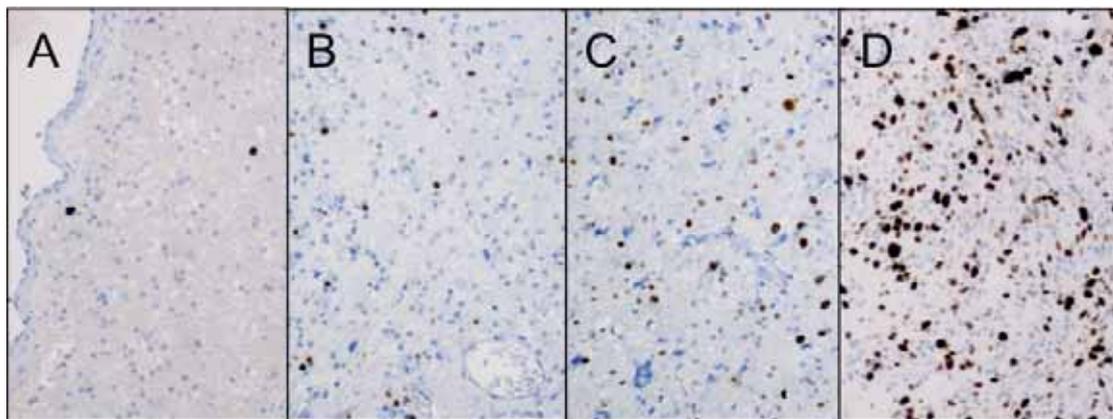


Figura. 5.28. Proliferación celular (Ki67) en casos de gliosis (A), astrocitomas difusos (B), astrocitomas anaplásicos (C) y GBM (D), 200x. Diagrama de cajas comparando los niveles de expresión entre los cuatro grupos estudiados (E), con diferencias significativas ($p < 0,001$).

RESULTADOS

Encontramos un punto de corte para Ki67 que permite diferenciar AID de alto y bajo grado, y GBM frente a otros grados, con buenos valores predictivos positivos y buenas sensibilidades (ver tabla 5.23). Además existen diferencias significativas en la supervivencia de los pacientes con Ki67 por encima del punto de corte (942 días de media) frente a los otros (1936 días de media), ver tabla 5.23 y fig. 5.29.

Ki67		
	Alto grado vs bajo grado	GBM vs otro grado
Punto de corte (%)	12	12
Sensibilidad (%)	79,5	88,9
Especificidad (%)	93,7	62,5
VPP (%)	98,4	76,2
VPN (%)	48,4	80,6
p-valor	<0,001	<0,001
IMPACTO SUPERVIVENCIA		
Global, p-valor	0,014	
Global, días	1936 vs 942	
Por grado, p-valor	ns	

Tabla 5.23. Puntos de corte de porcentaje de expresión de Ki67 con mejor sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de AID de bajo grado frente a alto grado (columna de la izquierda) y de GBM frente al resto de AID (columna de la derecha), con sus respectivos parámetros estadísticos y su impacto en supervivencia.

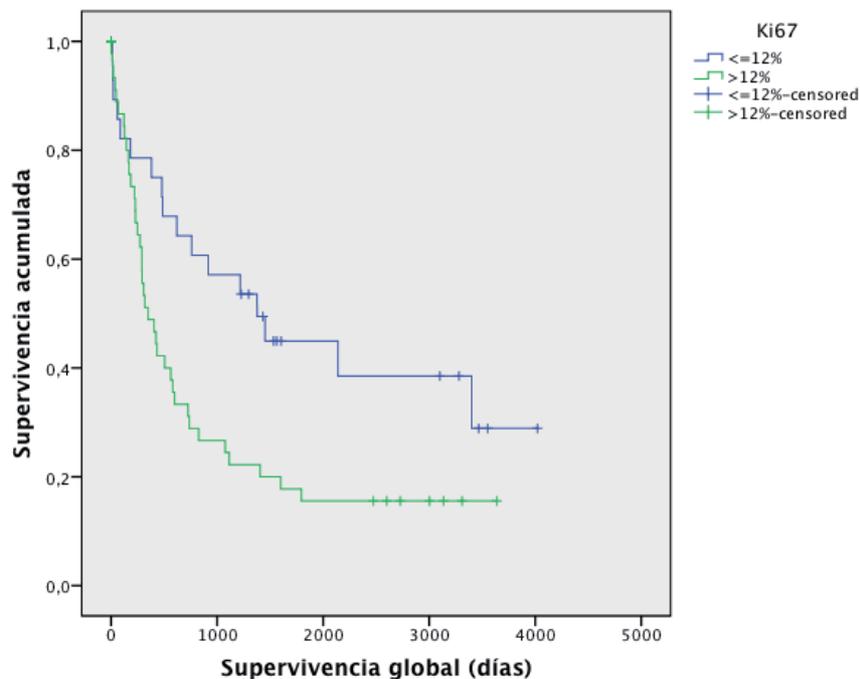


Figura 5.29. Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) en función del porcentaje de Ki67 (punto de corte de 12%). Diferencias significativas ($p=0,014$).

V.2.I. Valoración conjunta de distintas proteínas

El estudio de correlación de las distintas variables demostró varias asociaciones, directas e inversas, detalladas en la siguiente tabla (tabla 5.24).

	EGFR	PTEN	pMAPK α	pMAPK γ	4E-BP1	p4E-BP1	eIF4E	peIF4E	pS6	Ciclina D1	Ki67
EGFR		0,181 ns	-0,315 0,008	-0,321 0,007	0,072 ns	0,220 0,047	0,181 ns	0,217 ns	0,118 ns	0,078 ns	0,151 ns
PTEN	0,181 ns		0,021 ns	0,021 ns	0,529 <0,001	0,366 0,001	0,515 <0,001	0,399 <0,001	0,024 ns	0,222 0,03	0,419 <0,001
pMAPK α	-0,315 0,008	0,021 ns		0,858 <0,001	0,204 ns	0,115 ns	0,048 ns	0,007 ns	0,108 ns	- 0,075 ns	-0,201 ns
pMAPK γ	-0,321 0,007	-0,103 ns	0,858 <0,001		-0,196 ns	-0,331 0,002	0,017 ns	0,007 ns	0,304 0,009	- 0,143 ns	-0,338 0,002
4E-BP1	0,072 ns	0,529 <0,001	0,204 ns	-0,196 ns		0,463 <0,001	0,463 <0,001	0,242 0,018	- 0,067 ns	0,329 0,001	0,523 <0,001
p4E-BP1	0,220 0,047	0,366 0,001	0,115 ns	-0,331 0,002	0,463 <0,001		0,506 <0,001	0,307 0,005	- 0,045 ns	0,206 0,043	0,561 <0,001
eIF4E	0,181 ns	0,515 <0,001	0,048 ns	0,017 ns	0,463 <0,001	0,506 <0,001		0,679 <0,001	0,028 ns	0,390 <0,001	0,506 <0,001
peIF4E	0,217 ns	0,399 <0,001	0,007 ns	0,007 ns	0,242 0,018	0,307 0,005	0,679 <0,001		0,245 0,026	0,289 0,005	0,446 <0,001
pS6	0,118 ns	0,024 ns	0,108 ns	0,304 0,009	-0,067 ns	-0,045 ns	0,028 ns	0,245 0,026		0,102 ns	-0,05 ns
Ciclina D1	0,078 ns	0,222 0,03	-0,075 ns	-0,143 ns	0,329 0,001	0,206 0,043	0,390 <0,001	0,289 0,005	0,102 ns		0,334 <0,001
Ki67	0,151 ns	0,419 <0,001	-0,201 ns	-0,338 0,002	0,523 <0,001	0,561 <0,001	0,506 <0,001	0,446 <0,001	-0,05 ns	0,334 <0,001	

Tabla 5.24. Correlaciones entre las distintas variables (en cada casilla, rho de Spearman y p-valor). En verde, asociaciones estadísticamente significativas, directas; en naranja, correlaciones inversas.

Mediante un modelo de regresión logística analizamos qué variables se asocian de manera independiente a diagnóstico de alto grado o diagnóstico de GBM. Los resultados de los modelos de regresión nos dan como mejores combinaciones estos puntos de corte:

- Casos que muestren 4E-BP1>85 y peIF4E>30: diagnóstico de GBM (VPP del 100%, p<0,001, fig.5.26.A)
- Casos que muestren Ciclina D1>2% y peIF4E>30: diagnóstico de alto grado (VPP del 98,7%, p<0,001, fig. 5.26.B).

- Casos que muestren $peIF4E < 30$ y $Ki67 < 12\%$: exclusión de GBM (VPN del 100%, $p < 0,001$, fig. 5.26.C).

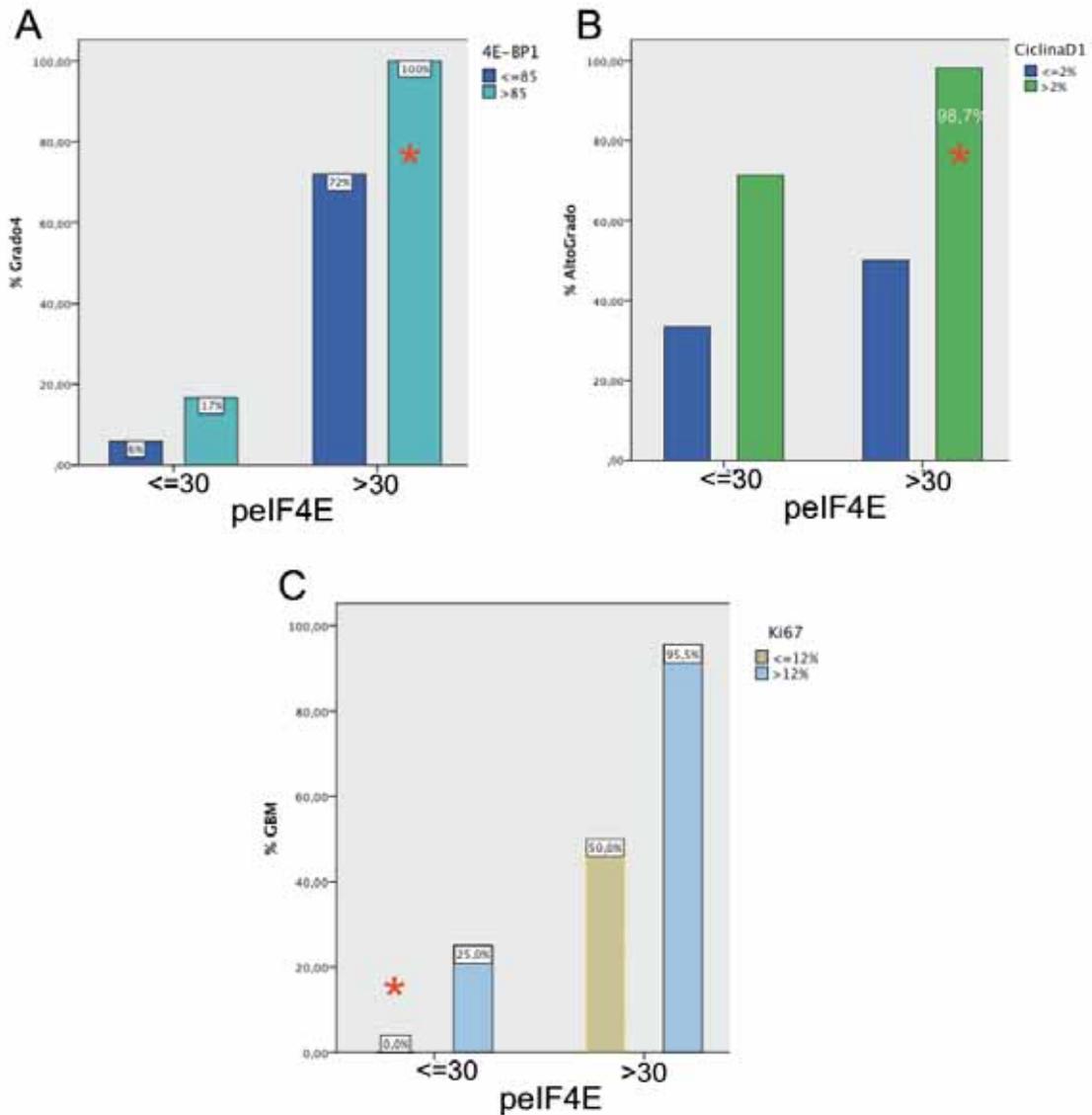


Figura 5.30. Distribución de casos en función de la expresión de $peIF4E$ y $4EBP1$ (A), $peIF4E$ y ciclina D1 (B) y $peIF4E$ y $Ki67$ (C). Los asteriscos rojos marcan las mejores combinaciones para diagnóstico de GBM (A), de alto grado (B), y exclusión de diagnóstico de GBM (C).

V.3. Glioblastomas secundarios

En los 60 casos de GBM recogidos se realizó estudio de mutación de $IDH1 R132H$ por inmunohistoquímica, encontrando dos casos mutados. Uno de estos casos era un paciente joven, de 35 años, con una biopsia previa de AA (confirmando que se trataba de un GBM secundario) y sobreexpresión de $p53$ (del 60%). Falleció 5 años

después del diagnóstico de GBM. El segundo caso con mutación de IDH1 R132H no presentaba antecedentes de lesión previa de menor grado, ni sobreexpresión de p53, pero se trataba de una paciente joven (31 años) fallecida en el postoperatorio inmediato.

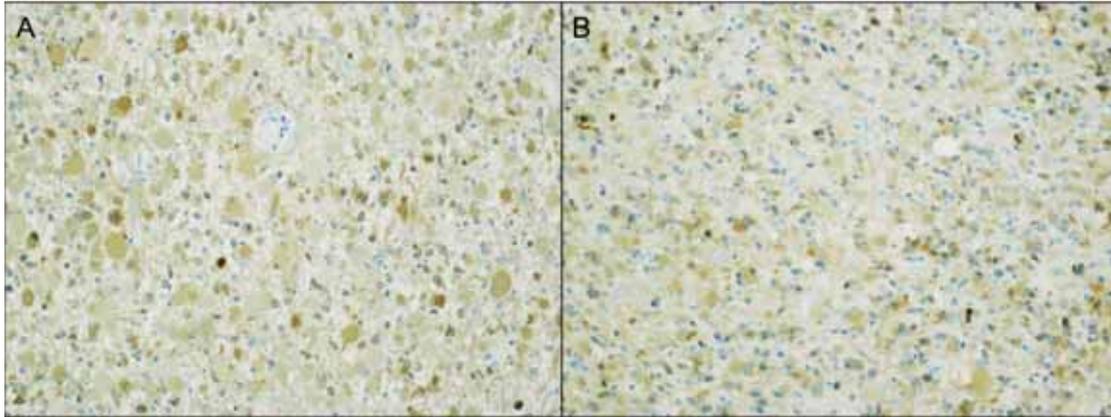


Figura 5.31. Estudio inmunohistoquímico de mutación de IDH1 R132H en los dos casos mutados, 200x.

Por otra parte, 9 casos mostraron sobreexpresión de p53 de más del 40% sin mutación de IDH1 R132H por inmunohistoquímica. En estos casos se exploró el estado de IDH mediante PCR de mutaciones de IDH1 R132, sin encontrar ningún caso mutado. De estos 9 casos, 7 pacientes eran mayores de 55 años, sin lesiones previas (por lo tanto, poco probable que correspondieran a GBM secundarios). Los otros dos casos, pacientes de 35 y 38 años (con p53 del 90% y 70% respectivamente), con una supervivencia de 2 y 3 años.

No se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de proteínas de las vías de señalización en los dos casos confirmados de GBM secundario respecto al resto de GBM de la serie (muestra insuficiente).

Además del primer caso de GBM secundario, se incluyeron en la serie biopsias repetidas de 3 pacientes: en un paciente la primera biopsia fue diagnosticada de AD y la segunda de AA, y los otros dos tuvieron dos biopsias de AA cada uno.

RESULTADOS

V.4. Tablas resumen

	Correlación con grado	p-valor
EGFR	Sí, directamente proporcional	0,022
PTEN	Sí, directamente proporcional	<0,001
pMAPKcit	No	ns
pMAPKnci	No	ns
p4E-BP1	Sí, directamente proporcional	<0,001
4E-BP1	Sí, directamente proporcional	<0,001
peIF4E	Sí, directamente proporcional	<0,001
eIF4E	Sí, directamente proporcional	<0,001
Ciclina D1	Sí, directamente proporcional	<0,001
pS6	No	ns
Ki67	Sí, directamente proporcional	<0,001

Tabla 5.25. Correlación de las proteínas estudiadas con grado tumoral y nivel de significancia estadística.

	Gliosis frente a			
	AD	AA	GBM	AID
EGFR	*	*	*	*
PTEN	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
pMAPKcit	ns	ns	0,003	0,003
pMAPKnci	ns	ns	ns	ns
p4E-BP1	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
4E-BP1	ns	<0,001	<0,001	<0,001
peIF4E	0,032	ns	<0,001	0,022
eIF4E	ns	0,036	<0,001	<0,001
Ciclina D1	ns	0,039	<0,001	0,004
pS6	ns	ns	ns	ns
Ki67				

Tabla 5.26. Resumen de la expresión de las proteínas estudiadas en situación de gliosis, comparada con la expresión en situación tumoral. Las celdas sombreadas en naranja indican que el nivel de expresión de la proteína es mayor en gliosis que en situación tumoral. En verde, el nivel de expresión en gliosis es inferior al encontrado en situación tumoral. *Estudio de EGFR no realizado en los casos de gliosis.

RESULTADOS

	Alto grado vs bajo grado			GBM vs otro grado			Impacto en supervivencia	Factor independiente
	Punto de corte	VPP (%)	p-valor	Punto de corte	VPP (%)	p-valor		
EGFR	200	93,8	0,011	200	81,3	<0,001	Sí, p=0,005	No
pMAPKc	37	92,3	ns	28	50	ns	No	No
pMAPKn	95	89,3	ns	15	49,3	ns	No	No
p4EBP1	130	95,7	<0,001	130	76,1	<0,001	No	No
4E-BP1	65	94,8	<0,001	85	83,3	<0,001	No	No
peIF4E	30	96,6	<0,001	40	87,7	<0,001	Sí, p<0,001	Sí
eIF4E	40	100	<0,001	40	88,6	<0,001	Sí, p=0,006	No
pS6	65	90,4	ns	65	75	0,007	ns	No
Ciclina D1	2	88,1	<0,001	2	64,3	<0,001	ns	No
Ki67	12	98,4	<0,001	12	76,2	<0,001	Sí, p=0,014	No

Tabla 5.27. Puntos de corte y valores predictivos positivos de niveles de expresión de las distintas proteínas estudiadas para el diagnóstico de astrocitoma de alto grado frente a astrocitoma de bajo grado, y para el diagnóstico de GBM frente a astrocitoma infiltrante de otro grado. Los puntos de corte corresponden a valores de Hscore, excepto para ciclina D1 y Ki67, valorados con porcentaje de expresión.

VI. DISCUSIÓN

VI. DISCUSIÓN

Los astrocitomas difusos infiltrantes suponen la neoplasia primaria más frecuente del sistema nervioso central. En particular, el extremo más maligno del grupo, el glioblastoma multiforme, es un tumor agresivo con una supervivencia media de 12 meses. Actualmente los tratamientos disponibles no suponen una mejora significativa del curso de la enfermedad. En los últimos años se han desarrollado toda una serie de tratamientos oncológicos “individualizados” mediante fármacos que tienen como diana una proteína alterada en el tumor. La detección del estado de esta proteína es esencial para prever si ese tratamiento es adecuado para el enfermo. En tumores astrocitarios se han descrito cambios moleculares que pueden ser dianas terapéuticas, o dar un mejor pronóstico al enfermo, pero a día de hoy el campo de las dianas terapéuticas sigue sin aportar tratamientos eficaces. Empiezan a describirse los primeros casos de respuesta al inhibidor de BRAF vemurafenib en xantastrocitomas pleomórficos con mutación de BRAF V600E^{109,110}.

El desarrollo de fármacos que tienen como diana proteínas de las vías de señalización hace que el estudio de estas vías gane importancia en un campo, el de los astrocitomas infiltrantes difusos, en el que existen pocas alternativas terapéuticas. Las principales vías son dos, la de AKT-PI3K-mTOR, y la de Ras-Raf-MAPK.

VI.1. AKT-PI3K-mTOR y Ras-Raf-MAPK, vías de señalización convergentes

Se ha descrito que la inhibición única de una de estas vías tiene escasos efectos sobre supervivencia y crecimiento tumoral. Yu et al describen respuesta en algunas líneas celulares a la inactivación de PI3K pero no en otras, consiguiendo respuesta global al añadir inhibidor de Mek1¹¹¹ (líneas celulares de carcinomas de mama, próstata, pulmón y colorrectal). Se encuentran resultados muy similares en modelos de cáncer de mama de tipo basal-like: Hoeflich et al demuestran que inhibir MAPK es una buena estrategia terapéutica en tumores con PTEN intacto (en ausencia de PTEN esta inhibición causa un aumento de la vía PI3K), pero es mejor combinar la inhibición de PI3K con la de MAPK, independientemente de cómo esté PTEN¹¹². Otros estudios revelan que es posible inhibir parcialmente el crecimiento celular con fármacos que tengan como diana proteínas de una de las dos vías, pero la proliferación celular sólo se detiene completamente con una combinación de fármacos que inhiban selectivamente las dos vías¹¹³. Teniendo en cuenta esta

DISCUSIÓN

convergencia y dependencia entre las dos principales vías de señalización (fig. 6.1), la diana terapéutica ideal sería un punto de convergencia de ambas vías. Además, saber el estado de esta proteína nos informaría acerca del estado proliferativo de la célula, independientemente del punto de inicio de la señal proliferativa. La proteína 4E-BP1 es un punto de convergencia de ambas vías. Junto con pS6, es un factor efector de mTOR, e integra señales de estímulos extracelulares, disponibilidad de aminoácidos y oxígeno de la célula. Como reflejo de la convergencia de estas vías, encontramos en nuestra serie casos con elevados niveles de fosforilación de 4E-BP1 y baja expresión de proteínas que se encuentran más arriba en la cascada de señalización, en una y otra vía. Sin embargo, la convergencia de las vías, más allá del evento molecular, debería tener implicaciones clínicas para su aplicación en la rutina diaria. Hasta ahora los estudios realizados se han centrado en líneas celulares y modelos animales, y en mucha menor proporción en humanos. Por este motivo, además de valorar las vías nos hemos centrado en aquellas proteínas que presenten algún tipo de correlación con factores clínico-patológicos convencionales y sean susceptibles de ser nuevas herramientas diagnósticas y/o terapéuticas.

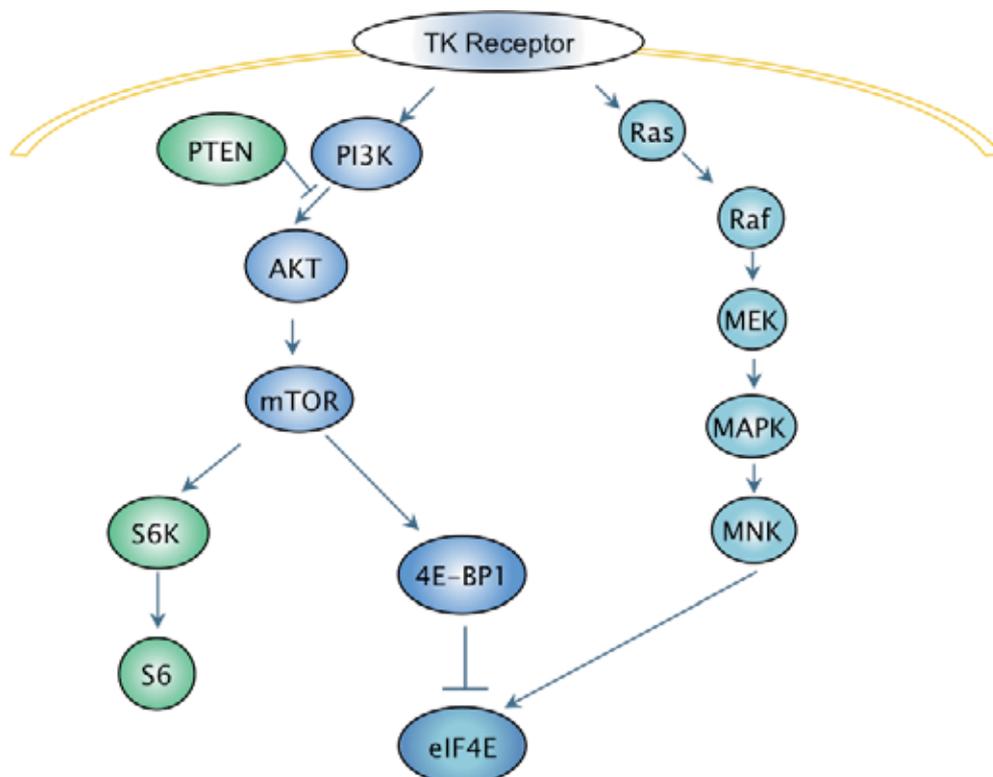


Figura 6.1. Esquema simplificado de la convergencia de las vías PI3K-AKT-mTOR y Ras-Raf-MAPK en eIF4E.

VI.1.a. 4E-BP1

Las proteínas implicadas en las vías de señalización, y en particular 4E-BP1 y su forma fosforilada se han estudiado en otros tumores, como mama, ovario, próstata y colon. La fosforilación de 4E-BP1 por mTOR libera eIF4E y permite la formación del complejo iniciador de la traducción eIF4F. En carcinoma de mama la sobreexpresión de p4E-BP1 se asocia con peor pronóstico, de manera independiente de otros factores, incluso del estado de HER2 o activaciones de las vías PI3K/AKT y MAPK¹⁰⁷. Existe además correlación entre la expresión de esta proteína y el tamaño tumoral, metástasis ganglionares y recurrencia loco-regional. No sólo la elevada expresión de 4E-BP1, sino también el ratio p4E-BP1:4E-BP1 se asocia a grado histológico y afectación ganglionar. En tumores con peor pronóstico hay mayor expresión de p4E-BP1, de manera que eIF4E puede actuar iniciando la traducción. También en carcinomas de ovario se ha encontrado correlación entre la expresión de p4E-BP1 y progresión tumoral y pronóstico desfavorable, de manera independiente al estado de HER2, EGFR, PTEN o PI3K¹⁰⁶. A nivel de próstata, los niveles de p4E-BP1 en neoplasia in situ de alto grado fueron significativamente mayores en los casos en los que hubo progresión a carcinoma respecto a los que no progresaron. Esto sugiere que el estudio de la expresión de p4E-BP1 podría ser de utilidad en la identificación de pacientes con mayor riesgo de progresar a carcinoma¹¹⁴, que se beneficiarían de terapias más agresivas. En carcinomas de colon, hasta el momento, no parece que un aumento de p4E-BP1 se asocie con una pobre diferenciación tumoral o con cambios en la supervivencia, pero sí con la presencia de metástasis ganglionares¹¹⁴.

En astrocitomas infiltrantes difusos la proteína 4E-BP1 y su forma fosforilada han sido poco estudiadas hasta ahora¹¹⁵⁻¹¹⁷. Los trabajos publicados utilizan anticuerpos diferentes contra esta proteína, contra distintos sitios de fosforilación, entre ellos (Ser36¹¹⁵, Ser65¹¹⁷) y respecto al utilizado en nuestro estudio (Thr70). La elección de este anticuerpo tuvo lugar, en nuestro caso, tras validación en un panel de líneas celulares y por la correlación entre los resultados obtenidos por Western-Blot y por inmunohistoquímica¹¹⁴. Las características clínico-patológicas de la población estudiada cumplen lo descrito en la literatura en cuanto a grupos de edad, distribución por sexos y tiempos de supervivencia media^{3,115,116}.

En el presente estudio encontramos correlación entre el grado tumoral y niveles de expresión las formas total y fosforilada de 4E-BP1. Estos resultados se han descrito previamente en la literatura en un único trabajo, en lo que respecta a p4E-BP1.

DISCUSIÓN

Korkolopoulou et al¹¹⁵ estudiaron una serie de 111 astrocitomas infiltrantes difusos, encontrando correlación entre la expresión de p4E-BP1 y el grado tumoral. De los distintos factores de la vía de mTOR estudiados por este grupo, el único que muestra correlación con MAPK es p4E-BP1. Describen que esta proteína tiene valor predictivo de peor pronóstico, independientemente del estatus mutacional de IDH1. Aunque también hemos encontrado que los niveles de p4E-BP1 correlacionan con supervivencia, p4E-BP1 no es un factor pronóstico independiente en esta serie. A pesar de no hallar relación con el estatus mutacional de IDH1, consideramos que el número de GBM que muestran la mutación IDH1 R132H es demasiado pequeño y no supone un grupo significativo con el que realizar comparaciones estadísticas.

Ermoian et al¹¹⁶ estudian niveles de p4E-BP1 mediante inmunoblotting en un grupo de 71 casos de astrocitomas infiltrantes difusos, distribuidos de manera bastante homogénea entre los tres grados de malignidad (28 grado II, 17 astrocitomas anaplásicos y 26 GBM), con un grupo control de 16 casos no tumorales. Encontraron resultados similares a los de nuestro estudio al comparar los 4 grupos (correlación estadísticamente significativa entre niveles de p4E-BP1 y progresión de grado tumoral) pero al eliminar el grupo control estas diferencias perdieron potencia estadística. Sí que encontraron diferencias en la expresión de pAKT entre el grupo formado por tumores de bajo grado y casos controles, con el grupo de tumores de alto grado (III y IV), y correlación inversa entre la expresión de PTEN y el grado tumoral, principalmente a expensas de una disminución en la expresión de PTEN en el grupo de GBM. En cuanto al complejo mTOR, encontraron disminución de los niveles de hamartina (TSC1) y tuberina (TSC2), proteínas supresoras de mTOR, conforme aumentaba el grado tumoral. Este cese en la inhibición de mTOR le permitiría ejercer su acción sobre 4E-BP1, fosforilándolo y aumentando así los niveles de p4E-BP1. Encontraron relación entre el aumento de pAKT y p4E-BP1, pero no entre pAKT y S6. Sin embargo, no hallaron relación entre ninguno de los factores estudiados y la supervivencia.

Riemenschneider et al¹¹⁷, en un estudio de 29 GBM, describen que la activación de AKT no implica un aumento estadísticamente significativo de 4E-BP1 en su forma fosforilada. En una vía lineal, la activación de AKT inhibiría el efecto supresor de TSC 1 y 2 sobre mTOR, provocando la fosforilación de 4E-BP1. Estos hallazgos van en contra de que se trate de una vía lineal, y ponen en evidencia que otras proteínas actúan sobre 4E-BP1.

VI.1.b. eIF4E

Este factor de iniciación es el componente mejor estudiado del complejo iniciador de la traducción eIF4F. Al ser el menos abundante de los componentes de eIF4F, es un factor limitante del inicio de la traducción.

Se ha descrito un aumento de la expresión de eIF4E en neoplasias de pulmón, colon, mama, próstata, vejiga, cérvix, ovario, tiroides, cabeza y cuello, y neoplasias hematológicas¹¹⁸. Además de esta sobreexpresión, eIF4E se relaciona con progresión tumoral y peor pronóstico¹¹⁹. La expresión en carcinoma de mama es mayor que en mama normal y en lesiones benignas, ya desde estadios iniciales (en el 50% de los carcinomas in situ). Niveles elevados de la proteína (determinados por Western-Blot) se han relacionado con recurrencia y muerte por enfermedad en este tipo de tumores¹²⁰. En neoplasias de vejiga superficiales, niveles elevados de la proteína se asocian con peor pronóstico y reducen el tiempo libre de progresión. Los tumores infiltrantes muestran niveles mayores de eIF4E que las neoplasias superficiales¹²¹. En adenocarcinomas de próstata el aumento de expresión de eIF4E se asocia con tumores en estadio avanzado, y niveles altos con tumores con Gleason superior a 7. El aumento de eIF4E no se asociaba con el índice de proliferación celular, indicando una relación cualitativa con enfermedad avanzada y no un simple reflejo de la activación del estado proliferativo del tumor^{122,123}. En lo referente a neoplasias pulmonares, se ha descrito un aumento de eIF4E en adenocarcinomas, pero no en carcinomas escamosos, respecto a tejido normal¹²⁴, y una asociación de niveles elevados de la proteína con grado histológico e invasividad del tumor en adenocarcinomas periféricos¹²⁵. También el carcinoma de cérvix presenta niveles elevados de eIF4E, desde la lesión displásica¹²⁶. En la misma línea que lo descrito en estos tumores, encontramos sobreexpresión de eIF4E en tumores astrocitarios respecto a situaciones de gliosis. Un único trabajo previo reseña esta sobreexpresión, entre astrocitomas de alto grado (10 casos de AA y GBM) y tejido cerebral no tumoral¹²⁷. La correlación estadísticamente significativa entre mayor expresión de eIF4E y agresividad o mayor grado tumoral en AID no había sido descrita hasta el momento, así como su relación con peor pronóstico. En otros tumores se ha descrito un aumento de expresión de eIF4E en lesiones neoplásicas frente a lesiones preneoplásicas (por ejemplo, mayor expresión de eIF4E en adenocarcinomas que en pólipos adenomatosos a nivel de colon¹²⁴, o en carcinomas infiltrantes respecto a tumores benignos de cabeza y cuello¹²⁸). Respecto al tejido cerebral no tumoral, Gu et al encuentran, como nosotros, expresión en neuronas piramidales y ocasionalmente en endotelios¹²⁷. En esta serie

DISCUSIÓN

se ha encontrado la proteína tanto en citoplasma como en núcleo. Esto puede explicarse por su implicación en el complejo de inicio de la traducción, que tiene lugar en el citoplasma, y por su participación en el secuestro de ciertos mRNAs y su exportación (se ha descrito localización nuclear en el 68% de los eIF4E¹²⁹).

La regulación de eIF4E puede hacerse mediante unión a sus proteínas de unión (4E-BP1 principalmente), o bien mediante fosforilación. eIF4E tiene un único sitio de fosforilación, Ser 209, sobre el que actúan MNK1 y MNK2. El significado biológico de la fosforilación de eIF4E y su efecto sobre la traducción no se comprenden bien todavía. Algunos estudios apuntan que la fosforilación de eIF4E disminuye la afinidad de éste por el extremo cap de la hebra de mRNA, facilitando la transferencia del eIF4E ligado a una hebra de RNAm que ya ha iniciado la traducción, a otra hebra todavía no traducida, aumentando así la tasa de RNAm traducidos¹³⁰. Esta fosforilación no parece ser importante en el funcionamiento normal de la célula sana, pero parece tener un papel clave en situaciones tumorales. Aunque se desconocen los mecanismos exactos, se ha descrito aumento de síntesis de varias proteínas involucradas en el desarrollo de neoplasias: factores antiapoptóticos (Mcl-1), proteínas implicadas en la degradación de la matriz extracelular y la invasión tumoral (MMP-3), y factores proliferativos (ciclina D1)¹²³.

La fosforilación de eIF4E aumenta en estadíos iniciales del desarrollo de tumores de mama, colon, estómago y pulmón; aumenta en carcinoma de próstata y se relaciona con crecimiento independiente de andrógenos¹³¹, pero no se han descrito diferencias de expresión entre tumores con y sin metástasis ganglionares¹³². Fan et al describen sobreexpresión de pEIF4E por estudio inmunohistoquímico en un caso de astrocitoma de una pequeña serie de 5 casos, sin expresión en tejido cerebral normal. Encontramos en nuestro trabajo un aumento de la forma fosforilada de eIF4E conforme aumenta el grado tumoral, siendo la expresión elevada de esta proteína el único factor pronóstico independiente de los implicados en las vías de señalización celular estudiados.

VI.1.c. pS6

S6, proteína de la subunidad ribosomal 40S, es el primer sustrato identificado de S6K, factor efector de mTOR. Su fosforilación se correlaciona con un aumento de la síntesis proteica¹⁰¹. La localización de la expresión de esta proteína se describe principalmente en citoplasma¹³³ (como en este estudio), aunque se encuentran en la literatura ejemplos de localización nuclear¹³⁴. En el presente trabajo no se ha

encontrado un aumento significativo de la expresión de la forma fosforilada de S6 conforme aumenta el grado de malignidad de la lesión. Se trata de un tema controvertido, ya que algunos trabajos previos muestran resultados similares^{115,116}, pero en otros casos se describe correlación entre aumento de la expresión de la proteína y grado de la lesión¹³³⁻¹³⁶. El grupo de Yang incluso describe pS6 como factor pronóstico independiente¹³³ y empieza a describirse como marcador predictivo de respuesta tumoral al tratamiento con inhibidores de mTOR en algunos tipos de sarcomas¹³⁷. Nosotros sin embargo encontramos expresión de esta proteína tanto en tumores como en situaciones de gliosis, sin que existan diferencias significativas en cuanto a intensidad de expresión entre ambas situaciones.

VI.1.d. EGFR

El receptor del factor de crecimiento epidérmico, EGFR, es una de las proteínas implicadas en la patogénesis de los GBM primarios. De hecho, encontramos unos niveles de expresión de la proteína significativamente mayores cuanto mayor es el grado de la lesión. Alrededor del 35-40% de los GBM primarios presentan amplificación del gen que codifica la proteína EGFR. Sin embargo, el porcentaje de GBM que en nuestra serie sobreexpresan la proteína es mucho mayor al porcentaje de amplificaciones descrito. La sobreexpresión de la proteína, además de por amplificación del gen, podría deberse a polisomía del cromosoma 7, aunque se describe una buena correlación entre amplificación del gen y sobreexpresión de proteína¹³⁸.

Aunque la mayoría de los tumores estudiados muestran un aumento de expresión de EGFR en nuestra serie, existen algunos que presentan sobreexpresión de proteínas que se encuentran por debajo en la vía de señalización sin que exista sobreexpresión de EGFR (20% de los GBM muestran niveles elevados de p4E-BP1 con EGFR inferior a 100/300). Esto pone de manifiesto que existen otros puntos desde los que se puede iniciar la señal de crecimiento o proliferativa. Encontramos una correlación significativa entre la expresión de EGFR y el grado tumoral del AID. Estudios previos han demostrado que la expresión de EGFR aumenta la migración e invasividad de las células tumorales^{139,140}, por lo que cabría suponer que se trata de un factor de peor pronóstico. Sin embargo, aunque en nuestra serie la expresión de EGFR tiene impacto pronóstico, no se trata de un factor pronóstico independiente. Heimberger et al describen resultados similares al estudiar la expresión de EGFR

DISCUSIÓN

total y de EGFR vIII en un grupo homogéneo de pacientes con GBM¹⁴¹, pero otros trabajos no encuentran repercusión de los niveles de EGFR en la supervivencia¹⁴².

VI.1.e. MAPK

Los estudios realizados en tumores cerebrales sobre MAPK se centran principalmente en astrocitomas pilocíticos, tumores bien delimitados, grado I, que afectan en general a población pediátrica o adultos jóvenes y tienen buen pronóstico. En estos tumores existe una alteración de B-Raf que consiste en duplicación y fusión con el gen KIAA^{143,144} y provoca una activación de la cascada de MAPK. La mutación de B-Raf V600E es otro punto activo de estudio de esta vía. Esta mutación produce una activación de MAPK sin necesidad de fosforilación de Ras. Se encuentra, en tumores cerebrales, en un pequeño porcentaje de astrocitomas pilocíticos (menos del 10%), pero sobretodo en xantastrocitomas pleomórficos (66%) y gangliogliomas (18%)¹⁴⁵. Sin embargo, esta vía está también implicada en la patogénesis de tumores agresivos como los AID. Cuando la vía de PI3K-AKT-mTOR se inhibe, se observa una activación de la vía de MAPK en células de GBM¹⁴⁶, y la inhibición directa de MAPK afecta al crecimiento del tumor¹¹². Estudios inmunohistoquímicos previos comparando astrocitomas anaplásicos y GBM describen una mayor expresión de pMAPK en este último grupo, aunque las diferencias no son significativas¹³⁸. En el presente estudio encontramos una sobreexpresión de pMAPK en los casos de astrocitomas infiltrantes, sin relación con el grado tumoral. De hecho, los niveles de Hscore encontrados son significativamente menores en el grupo tumoral respecto a los casos de gliosis reactiva, y en particular en el grupo de GBM. A diferencia de otros grupos¹⁴², no hemos encontrado correlación entre niveles de pMAPK e índice de proliferación celular.

VI.1.f. PTEN

La proteína PTEN ejerce un efecto supresor en la vía PI3K-AKT-mTOR, al inhibir el paso de PI3K a AKT. Por ello, alteraciones moleculares de PTEN que supongan una modificación de su papel supresor favorecen la proliferación celular. Se describe en la literatura una correlación inversa entre niveles de expresión de PTEN y grado histológico de astrocitomas, hallando niveles significativamente más bajos de PTEN

en GBM que en AA y correlación directa entre niveles de PTEN y supervivencia (supervivencia baja en casos con niveles bajos de PTEN)¹⁴⁷. En este estudio se demuestra expresión de PTEN significativamente mayor en AID que en situación de reactividad, pero no se ha encontrado una correlación con el grado tumoral. Sin embargo, los niveles en GBM son mayores que en AID de menor grado, y existe una correlación positiva entre PTEN y 4E-BP1, p4E-BP1, eIF4E, pEIF4E, ciclina D1 y Ki67. Aunque esto pueda parecer paradójico al comparar con la literatura previa, los resultados del grupo de Pelloski¹⁴⁸ siguen esta línea, con una asociación directa entre PTEN y mTOR, sin encontrar asociación inversa entre PTEN y AKT. Podría ser porque el estado funcional de PTEN no sea valorado mediante su expresión inmunohistoquímica, aunque la influencia de otros factores sobre AKT podría también explicar estos resultados, como en carcinomas de mama, donde se ha descrito que el receptor de estrógenos puede ejercer mayor efecto sobre AKT que PTEN¹⁴⁹.

VI.1.g. Ciclina D1

El ciclo celular está controlado por una serie de complejos ciclina/quinasas dependientes de ciclinas (CDK) que se activan de manera secuencial. Ciclina D1 interviene en el control de la progresión de G1, mediante la formación del complejo ciclina D1/CDK4. Con frecuencia ciclina D1 se encuentra sobreexpresada como resultado de alteraciones cromosómicas (reordenamientos, amplificaciones) pero también se ha descrito sobreexpresión sin este tipo de alteraciones. Se ha descrito un aumento de expresión de esta proteína en carcinoma de mama, carcinoma escamoso de cabeza y cuello y carcinomas de esófago y recto¹⁵⁰. En tumores astrocitarios hemos encontrado en este trabajo una asociación significativa entre el aumento de expresión de esta proteína y el grado de malignidad del AID. Esta asociación corrobora observaciones previas al respecto en trabajos realizados por Chakrabarty¹⁵¹ y Sallinen¹⁵². En este último se describe ciclina D1 como factor pronóstico. En nuestra serie la relación entre la expresión de ciclina D1 y la supervivencia del paciente no alcanza la significación estadística ($p=0,052$).

A pesar de regular la síntesis proteica cap-dependiente de manera global, eIF4E contribuye a la progresión hacia malignidad al permitir la traducción selectiva de mRNAs que codifican proteínas clave en el crecimiento celular, la angiogénesis, supervivencia y malignidad¹²⁰. Ciclina D1 es uno de estos mRNAs (junto con c-myc, VEGF y MMP9). La asociación entre niveles de ciclina D1 y eIF4E (la forma total) se

DISCUSIÓN

ha descrito a nivel de carcinomas de colon¹²⁴, y encontramos también en AID una asociación positiva entre expresión de la forma fosforilada de eIF4E y niveles de ciclina D1. En tumores de próstata y vejiga se ha descrito una asociación similar, entre niveles de eIF4E y VEGF, y en carcinoma de mama entre eIF4E y myc¹²⁴.

VI.1.h. Ki67

Existen numerosos estudios acerca de la actividad proliferativa de los AID, y del valor clínico que ésta puede tener. Ki67 es un anticuerpo monoclonal de tipo IgG1, que reconoce un antígeno presente en células proliferativas, ausente en células quiescentes (se expresa en todas las fases del ciclo excepto en G₀ e inicio de G₁). Una revisión de los trabajos publicados sobre Ki67 en AID¹⁵³ revela que existe, como en nuestra serie, un aumento significativo de la actividad proliferativa conforme aumenta el grado histológico de la lesión. Se describe además que tiene valor pronóstico tanto en supervivencia como en la recurrencia de estos tumores. En el presente trabajo se ha encontrado valor pronóstico del Ki67 en lo que respecta a la supervivencia, aunque no es factor pronóstico independiente. Debido a la heterogeneidad de los valores descritos en los distintos trabajos (por ejemplo, Ki67 medio del 9,12%¹⁵⁴ y del 24,3%¹⁵⁵ en dos grupos similares de GBM), no ha sido posible establecer unos puntos de corte globales para aplicar un determinado pronóstico, y se desaconseja utilizarlo aislado en la toma de decisiones.

VI.2. Estudio de las vías de señalización en situación de gliosis reactiva

El sistema nervioso central responde a distintas lesiones mediante una proliferación glial no tumoral, gliosis o astrogliosis. Esta respuesta puede ser beneficiosa, pero también dañina para el resto del encéfalo. Por ejemplo, la formación de una cicatriz glial en situaciones de isquemia, puede, además de suplir la pérdida de parénquima secundaria a la isquemia, tener efectos adversos sobre la neuroplasticidad¹⁵⁶. Este doble filo de la reacción gliótica ha promovido el estudio de sus alteraciones moleculares, con el fin de poder inhibirla. Se ha descrito activación de la vía de mTOR en estados post-traumáticos¹⁵⁷ y esclerosis mesial¹⁵⁸, entre otros, y de la vía de MAPK en situaciones de isquemia cerebral¹⁵⁹. Sin embargo el estado de los factores 4E-BP1 y eIF4E está todavía poco descrito en estas situaciones no tumorales. En el presente trabajo demostramos que en esta situación de reactividad

tiene lugar efectivamente una activación de las vías de señalización. Esta activación es, en general, significativamente menor que en situaciones tumorales (para p4E-BP1, 4E-BP1, eIF4E, pelf4E y ciclina D1), aunque en nuestra serie encontramos niveles de pMAPK significativamente mayores en situación reactiva que en AID. Un caso particular es el astrocitoma difuso, grado II, que muestra niveles de expresión de algunas proteínas de las vías de señalización similares (4E-BP1, eIF4E, ciclina D1) o incluso inferiores (pelf4E) a los encontrados en gliosis. El estudio de estas proteínas no permitiría por lo tanto un diagnóstico diferencial entre una proliferación astrocitaria reactiva o tumoral de bajo grado. Otro dato interesante es la aparente diferencia en la expresión de eIF4E entre gliosis alrededor de metástasis y alrededor de malformaciones arteriovenosas, mayor en el primer caso. Aunque no se alcanza la significación estadística ($p=0,066$), posiblemente al aumentar el número de casos obtendríamos diferencias significativas. En este sentido, el uso de fármacos que tengan como diana eIF4E (ver apartado VI.4) podría tener un efecto en lesiones metastásicas cerebrales.

VI.3. Implicaciones diagnósticas y pronósticas

Las biopsias diagnósticas de AID son con frecuencia de pequeño tamaño. En ocasiones las características histológicas observadas en el material remitido no coinciden con el aspecto radiológico de la lesión. En este punto el resultado de algunos estudios moleculares, como la presencia de amplificación de EGFR, pueden ayudar a la toma de decisiones terapéuticas. ¿Podrían los niveles de expresión de algunas de las proteínas estudiadas ser de ayuda en estas situaciones? En este trabajo, niveles elevados de algunas de estas proteínas han demostrado tener importante valor predictivo positivo en el diagnóstico de astrocitomas de alto grado y de GBM, e incluso, para algunas, impacto en la supervivencia de los pacientes. De esta manera, aunque no se cumplan los criterios histológicos, si una lesión astrocitaria infiltrante difusa muestra expresión de 4E-BP1 y pelf4E con Hscores superiores a 85/300 y 30/300 respectivamente, podríamos sugerir un diagnóstico de GBM (valor predictivo positivo de 100%, $p<0,001$). En este caso, es probable que exista un sesgo en la toma de la muestra y sería importante una nueva biopsia (hasta validación de los resultados actuales en series más amplias). Por otra parte, los casos con pelf4E inferior a 30/300 y Ki67 inferior a 12%, no serán GBM (valor predictivo negativo del 100%, $p<0,001$). En estos casos, habría que valorar el balance beneficio/riesgo de una nueva biopsia (fig. 6.2).

DISCUSIÓN

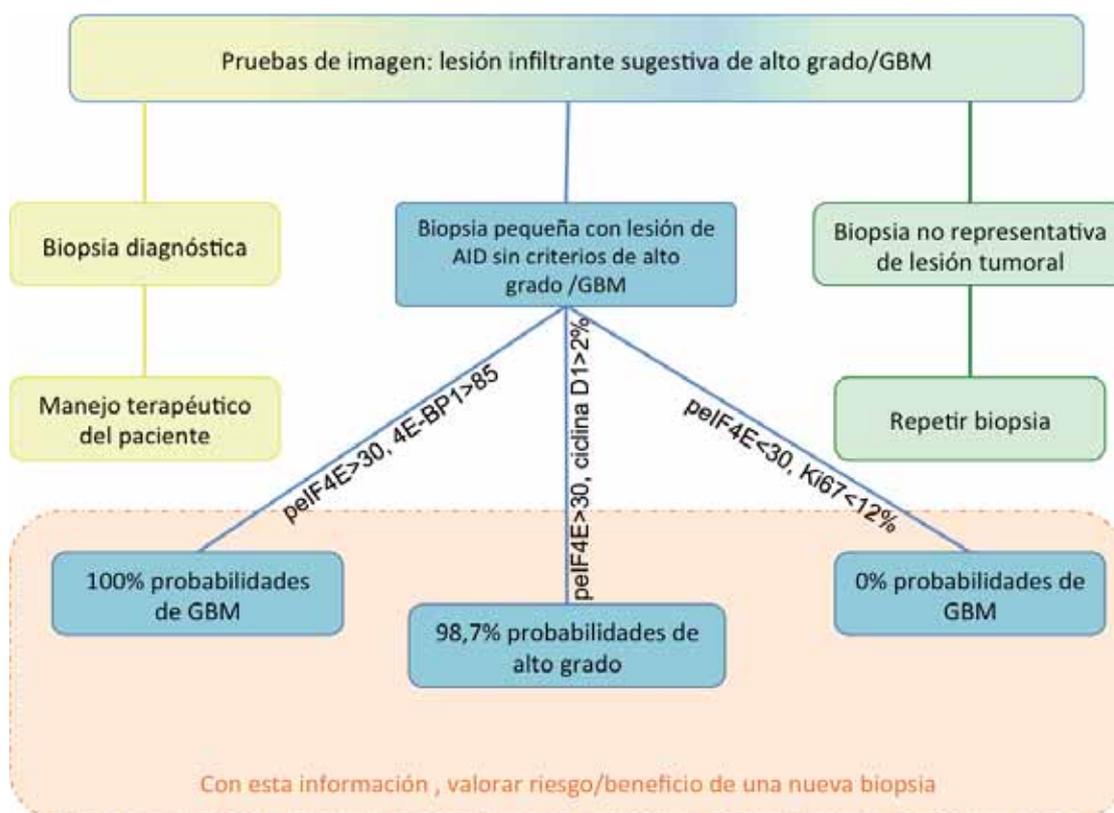


Figura 6.2. Algoritmo propuesto de aplicación de algunos factores de las vías de señalización en el diagnóstico de biopsias de AID.

A día de hoy, el tratamiento que se le puede ofrecer al paciente depende principalmente del diagnóstico y grado histológico de la lesión. Por ello se han buscado en este estudio los puntos de corte con mejor sensibilidad y especificidad para un diagnóstico de alto grado o de GBM. Otros puntos de corte ofrecían, para algunas variables, impacto estadístico en la supervivencia del paciente, pero se ha considerado de menor utilidad práctica para la toma de decisiones terapéuticas en el momento actual. En el presente estudio distintas variables han correlacionado con una menor supervivencia: edad, grado histológico, niveles de p4E-BP1, CiclinaD1, EGFR, eIF4E, pElF4E y actividad proliferativa (Ki67). Sin embargo, sólo tres de ellos (edad, grado histológico y niveles de pElF4E) han resultado ser factores pronóstico independientes.

VI.4. Implicaciones terapéuticas

Dada la demostrada convergencia de las principales vías de señalización, el punto terapéutico ideal sería una de las proteínas en las que convergen ambas vías y que

sus niveles tengan impacto sobre la supervivencia del paciente. La forma fosforilada de eIF4E, punto de convergencia de las vías PI3K-AKT-mTOR y Ras-Raf-MAPK, ha resultado ser el único factor pronóstico independiente en esta serie de AID. Por ello, estos tumores podrían beneficiarse especialmente de terapias dirigidas a la quinasa que fosforila eIF4E y a eIF4E.

Se han realizado intentos de detener el efecto proliferativo de eIF4E sobre líneas celulares, encontrando como consecuencias citotoxicidad y actividad anti-invasiva además de un aumento en la sensibilidad a quimioterapia. Para su aplicación clínica, se ha intentado inhibir su expresión con oligonucleótidos antisentido, bloquear su unión a eIF4G, inhibir su fosforilación con inhibidores de MAPK y con ribavirina¹¹⁹. Recientemente se ha demostrado que la fosforilación de eIF4E confiere a la células resistencia a estrés oxidativo, privación de nutrientes y estrés citotóxico, aumentando la supervivencia y facilitando la recuperación celular, proliferación y progresión tumoral¹⁶⁰. Inhibir la fosforilación de eIF4E mediante la inhibición de MAPK y MNKs podría por lo tanto bloquear el efecto proliferativo de eIF4E. Inhibidores de MNKs como el CGP 57380 han conseguido, en modelo animal, parar el crecimiento de GBM¹⁶¹; este efecto se potencia al añadir al tratamiento inhibidores de mTOR. Se ha demostrado in vitro que el bloqueo de la fosforilación de eIF4E que ejerce CGP 57380 es suficiente para reducir la resistencia celular al estrés y a agentes quimioterápicos¹⁶⁰, por lo que podría ser de utilidad para sensibilizar las células neoplásicas a tratamientos anticancerígenos.

Con el fin de inhibir el efecto de eIF4E, se ha llevado a cabo la síntesis de nucleótidos antisentido que interfieren en el RNAm de eIF4E. A pesar de los buenos resultados obtenidos in vitro e in vivo (inhibición de la proliferación y de la supervivencia de células tumorales sin toxicidad significativa en ratones^{122,162}) no se ha observado respuesta tumoral en un ensayo de tumores sólidos en fase avanzada¹⁶³. Actualmente se están llevando a cabo ensayos clínicos en fase I/II, que combinan estos nucleótidos antisentido con quimioterapia habitual en carcinoma pulmonar de célula no pequeña y tumores de próstata resistentes a castración (NCT01234038 y NCT01234025), sin resultados publicados todavía.^{119,131}

La ribavirina, nucleósido con actividad antiviral, ha demostrado tener actividad antitumoral en base a actividad anti-eIF4E. De hecho se ha llevado a cabo un ensayo clínico en leucemia mieloide aguda M4/M5 con ribavirina en monoterapia (NCT00559091)¹⁶⁴, con buenos resultados en 3/11 pacientes reclutados (una remisión completa y dos parciales), sin toxicidad significativa.

DISCUSIÓN

VI.5. Limitaciones del estudio

Respecto a trabajos similares llevados a cabo en otros tumores, los astrocitomas infiltrantes difusos presentan características que los hacen diferentes y limitan su estudio. La presencia de rasgos histológicos como mitosis, necrosis, proliferación vascular (que en otros tipos histológicos pueden estudiarse como factores de mal pronóstico) definen en este campo un grado tumoral específico, y por lo tanto ya conllevan peor pronóstico. El tamaño de la lesión es otro factor difícil de valorar en AID, ya que la localización de la lesión en el parénquima cerebral, y las estructuras anatómicas que esté afectando van a influir de manera determinante en el pronóstico del paciente. Esta influencia puede ser directa (si están involucradas estructuras anatómicas vitales) o indirecta (si la localización de la lesión no permite un tratamiento quirúrgico amplio, por ejemplo afectación de áreas motoras primarias). La extensión metastásica de la lesión es otro parámetro difícil de explorar en estos tumores, debido a su extrema infrecuencia.

Aunque no se ha tenido en cuenta el tratamiento recibido en cada caso, se considera que, al haber sido tratados en el mismo centro, han seguido esquemas de quimio y radioterapia similares. Los GBM posteriores al 2004 fueron tratados siguiendo el régimen de Stupp¹⁶⁵ (añadir quimioterapia a la radioterapia tras resección quirúrgica).

Durante la realización del trabajo, no pudo realizarse estudio inmunohistoquímico de AKT, mTOR ni pmTOR, por lo que se consideró la fosforilación de S6 un indicador de la activación de la vía. Tampoco se pudieron realizar estudios que requirieran tejido en fresco, como Western-Blot, ni arrays de expresión. Sería interesante poder describir el subtipo molecular de los GBM de la serie y ver si existen diferencias entre los cuatro grupos.

De la misma manera que las características morfológicas, la expresión de las proteínas estudiadas es heterogénea en la extensión del tumor, especialmente pMAPK y pS6. En la literatura se ha descrito heterogeneidad de AKT y mTOR. El patrón de factores centrales en las vías (4E-BP1, eIF4E) era más homogéneo a lo largo del tumor, aumentando su fiabilidad diagnóstica¹⁶⁶.

No se ha podido estudiar a fondo en esta serie el papel de las vías de señalización en glioblastomas secundarios, por el escaso número de este tipo de GBM incluidos. En dos casos se pudo confirmar la mutación de IDH1 R132H por estudio inmunohistoquímico, pero en otros dos casos correspondientes a pacientes jóvenes con elevada expresión de p53 no se pudo confirmar alteración de IDH tras estudio inmunohistoquímico y secuenciación de IDH1 R132. Es posible que estos pacientes

tuvieran alteraciones de IDH2 (descritas en un 3% de GBM¹⁶⁷), que no han sido exploradas en este trabajo. Sería interesante un estudio en pacientes con GBM secundarios o con mutación de IDH (factor independiente de mejor pronóstico) para estudiar en qué medida se diferencian de los GBM primarios en expresión de factores de las vías de señalización.

CONCLUSIONES

VII. CONCLUSIONES

1. Los niveles de expresión de los factores implicados en las vías de señalización celular se encuentran incrementados en situaciones de proliferación glial, tanto reactiva como tumoral. No obstante, la activación es significativamente más elevada en los astrocitomas infiltrantes difusos.
2. En la progresión desde astrocitomas de grado II a glioblastomas, se ha observado un aumento de los niveles de expresión de las proteínas 4E-BP1 y eIF4E, tanto en la forma total como en la forma fosforilada. También sigue este patrón la expresión de EGFR, PTEN, ciclina D1 y Ki67.
3. En la progresión desde astrocitomas de grado II a glioblastomas, no se ha observado un aumento de los niveles de expresión de las proteínas pMAPK y pS6.
4. En los estudios de correlación clínico-patológica, se ha constatado que la expresión de eIF4E (total y fosforilado), EGFR y Ki67 se relacionan con la supervivencia del paciente. El factor pEIF4E es el único factor pronóstico independiente, tras el análisis multivariante.
5. De los otros factores estudiados, no se ha observado correlación estadísticamente significativa entre niveles de expresión y supervivencia, incluyendo la proteína pS6.
6. Con los resultados obtenidos se concluye que los niveles de expresión de 4E-BP1 y eIF4E, así como de sus formas fosforiladas, son centrales en la progresión tumoral de los astrocitomas y se propone que pueden ser eventuales dianas terapéuticas. Su bloqueo puede ser de relevancia

clínica en el control terapéutico de los astrocitomas malignos y glioblastomas.

7. A nivel diagnóstico, el estudio combinado de niveles de expresión de pEIF4E, 4E-BP1, ciclina D1 y el índice de proliferación celular Ki67 pueden ser de ayuda a la hora de discernir astrocitomas de alto y bajo grado, y GBM frente a otros astrocitomas infiltrantes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bailey P, Cushing H. *A classification of the tumors of the glioma group on a histogenetic basis with a correlated study of prognosis*. 1926.
2. KERNOHAN JW, MABON RF. A simplified classification of the gliomas. *Proc Staff Meet Mayo Clin*. 1949;24(3):71-75.
3. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK. *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2007.
4. Burger PC, Scheithauer BW. *Tumors of the Central Nervous System*. Vol 7. Washington: American Registry of Pathology and Armed Forces Institute of Pathology; 2007.
5. Brat DJ, Van Meir EG. Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis, and accelerated growth in glioblastoma. *Lab Invest*. 2004;84(4):397-405.
6. Brat DJ, Castellano-Sanchez AA, Hunter SB, et al. Pseudopalisades in glioblastoma are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating cell population. *Cancer Res*. 2004;64(3):920-927.
7. Burger PC, Vollmer RT. Histologic factors of prognostic significance in the glioblastoma multiforme. *Cancer*. 1980;46(5):1179-1186.
8. Margetts JC, Kalyan-Raman UP. Giant-celled glioblastoma of brain. A clinico-pathological and radiological study of ten cases (including immunohistochemistry and ultrastructure). *Cancer*. 1989;63(3):524-531.
9. Shinojima N, Kochi M, Hamada J, et al. The influence of sex and the presence of giant cells on postoperative long-term survival in adult patients with supratentorial glioblastoma multiforme. *J Neurosurg*. 2004;101(2):219-226.
10. Scherer H. The forms of growth in gliomas and their practical significance. Vol 63. *Brain* 1940:1-35.
11. Scherer HJ. Cerebral astrocytomas and their derivatives. *Am J Cancer*. 1940;40:159-198.
12. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol*. 2007;170(5):1445-1453.
13. Balss J, Meyer J, Mueller W, Korshunov A, Hartmann C, von Deimling A. Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol*. 2008;116(6):597-602.
14. Ohgaki H, Watanabe K, Peraud A, et al. A case history of glioma progression. *Acta Neuropathol*. 1999;97(5):525-532.
15. Ohgaki H, Kleihues P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2005;64(6):479-489.
16. Watanabe K, Sato K, Biernat W, et al. Incidence and timing of p53 mutations during astrocytoma progression in patients with multiple biopsies. *Clin Cancer Res*. 1997;3(4):523-530.
17. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res*. 2004;64(19):6892-6899.
18. Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res*. 2013;19(4):764-772.
19. <http://www.seom.org>.
20. <http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/mortalidad-cne.shtml>.

BIBLIOGRAFÍA

21. Sant M, Minicozzi P, Lagorio S, et al. Survival of European patients with central nervous system tumors. *Int J Cancer*. 2012;131(1):173-185.
22. Lee SJ, Kim JH, Kim YM, et al. Perfusion MR imaging in gliomas: comparison with histologic tumor grade. *Korean J Radiol*. 2001;2(1):1-7.
23. Burger PC, Heinz ER, Shibata T, Kleihues P. Topographic anatomy and CT correlations in the untreated glioblastoma multiforme. *J Neurosurg*. 1988;68(5):698-704.
24. Kelly PJ, Daumas-Duport C, Scheithauer BW, Kall BA, Kispert DB. Stereotactic histologic correlations of computed tomography- and magnetic resonance imaging-defined abnormalities in patients with glial neoplasms. *Mayo Clin Proc*. 1987;62(6):450-459.
25. Fuentes-Raspall R, Vilardell L, Perez-Bueno F, et al. Population-based incidence and survival of central nervous system (CNS) malignancies in Girona (Spain) 1994-2005. *J Neurooncol*. 2011;101(1):117-123.
26. Böglér O, Huang H, Kleihues P, Cavenee W. The p53 gene and its role in human brain tumors. *Glia*. 1995;15:308-327.
27. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Sci*. 2009;100(12):2235-2241.
28. Rees JH, Wen PY. *Neuro-oncology*. Philadelphia: Saunders/Elsevier; 2010.
29. Watanabe K, Peraud A, Gratas C, Wakai S, Kleihues P, Ohgaki H. p53 and PTEN gene mutations in gemistocytic astrocytomas. *Acta Neuropathol*. 1998;95(6):559-564.
30. Okamoto Y, Di Patre PL, Burkhard C, et al. Population-based study on incidence, survival rates, and genetic alterations of low-grade diffuse astrocytomas and oligodendrogliomas. *Acta Neuropathol*. 2004;108(1):49-56.
31. Reifenberger J, Ring GU, Gies U, et al. Analysis of p53 mutation and epidermal growth factor receptor amplification in recurrent gliomas with malignant progression. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1996;55(7):822-831.
32. Ichimura K, Bolin MB, Goike HM, Schmidt EE, Moshref A, Collins VP. Dereglulation of the p14ARF/MDM2/p53 pathway is a prerequisite for human astrocytic gliomas with G1-S transition control gene abnormalities. *Cancer Res*. 2000;60(2):417-424.
33. James CD, Carlbom E, Nordenskjold M, Collins VP, Cavenee WK. Mitotic recombination of chromosome 17 in astrocytomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(8):2858-2862.
34. Rasheed BK, McLendon RE, Herndon JE, et al. Alterations of the TP53 gene in human gliomas. *Cancer Res*. 1994;54(5):1324-1330.
35. von Deimling A, Bender B, Jahnke R, et al. Loci associated with malignant progression in astrocytomas: a candidate on chromosome 19q. *Cancer Res*. 1994;54(6):1397-1401.
36. Motomura K, Mittelbronn M, Paulus W, et al. PDGFRA gain in low-grade diffuse gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2013;72(1):61-66.
37. Heldin CH, Westermark B. Platelet-derived growth factor: mechanism of action and possible in vivo function. *Cell Regul*. 1990;1(8):555-566.
38. Alentorn A, Marie Y, Carpentier C, et al. Prevalence, clinico-pathological value, and co-occurrence of PDGFRA abnormalities in diffuse gliomas. *Neuro Oncol*. 2012;14(11):1393-1403.
39. Varela M, Ranuncolo SM, Morand A, et al. EGF-R and PDGF-R, but not bcl-2, overexpression predict overall survival in patients with low-grade astrocytomas. *J Surg Oncol*. 2004;86(1):34-40.

40. Ribom D, Andrae J, Frielingsdorf M, Hartman M, Nistér M, Smits A. Prognostic value of platelet derived growth factor alpha receptor expression in grade 2 astrocytomas and oligoastrocytomas. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2002;72(6):782-787.
41. Arteaga CL. Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression? *Oncologist*. 2002;7 Suppl 4:31-39.
42. Fuller GN, Bigner SH. Amplified cellular oncogenes in neoplasms of the human central nervous system. *Mutat Res*. 1992;276(3):299-306.
43. Watanabe K, Tachibana O, Sata K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol*. 1996;6(3):217-223; discussion 223-214.
44. Biernat W, Huang H, Yokoo H, Kleihues P, Ohgaki H. Predominant expression of mutant EGFR (EGFRvIII) is rare in primary glioblastomas. *Brain Pathol*. 2004;14(2):131-136.
45. Ohgaki H. Genetic pathways to glioblastomas. *Neuropathology*. 2005;25(1):1-7.
46. Hurtt MR, Moossy J, Donovan-Peluso M, Locker J. Amplification of epidermal growth factor receptor gene in gliomas: histopathology and prognosis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1992;51(1):84-90.
47. Torp SH, Helseth E, Dalen A, Unsgaard G. Relationships between Ki-67 labelling index, amplification of the epidermal growth factor receptor gene, and prognosis in human glioblastomas. *Acta Neurochir (Wien)*. 1992;117(3-4):182-186.
48. Shinjima N, Tada K, Shiraishi S, et al. Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer Res*. 2003;63(20):6962-6970.
49. Simmons ML, Lamborn KR, Takahashi M, et al. Analysis of complex relationships between age, p53, epidermal growth factor receptor, and survival in glioblastoma patients. *Cancer Res*. 2001;61(3):1122-1128.
50. Schmidt MC, Antweiler S, Urban N, et al. Impact of genotype and morphology on the prognosis of glioblastoma. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2002;61(4):321-328.
51. Huncharek M, Kupelnick B. Epidermal growth factor receptor gene amplification as a prognostic marker in glioblastoma multiforme: results of a meta-analysis. *Oncol Res*. 2000;12(2):107-112.
52. Smith JS, Tachibana I, Passe SM, et al. PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93(16):1246-1256.
53. Batchelor TT, Betensky RA, Esposito JM, et al. Age-dependent prognostic effects of genetic alterations in glioblastoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10(1 Pt 1):228-233
54. Gan HK, Kaye AH, Luwor RB. The EGFRvIII variant in glioblastoma multiforme. *J Clin Neurosci*. 2009;16(6):748-754.
55. Schwechheimer K, Huang S, Cavenee WK. EGFR gene amplification--rearrangement in human glioblastomas. *Int J Cancer*. 1995;62(2):145-148.
56. Sugawa N, Ekstrand AJ, James CD, Collins VP. Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(21):8602-8606.

BIBLIOGRAFÍA

57. Li J, Yen C, Liaw D, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*. 1997;275(5308):1943-1947.
58. Myers MP, Stolarov JP, Eng C, et al. P-TEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual-specificity phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(17):9052-9057.
59. Tamura M, Gu J, Matsumoto K, Aota S, Parsons R, Yamada KM. Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science*. 1998;280(5369):1614-1617.
60. Mellinghoff IK, Wang MY, Vivanco I, et al. Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *N Engl J Med*. 2005;353(19):2012-2024.
61. Duerr EM, Rollbrocker B, Hayashi Y, et al. PTEN mutations in gliomas and glioneuronal tumors. *Oncogene*. 1998;16(17):2259-2264.
62. Knobbe CB, Merlo A, Reifenberger G. Pten signaling in gliomas. *Neuro Oncol*. 2002;4(3):196-211.
63. Tohma Y, Gratas C, Biernat W, et al. PTEN (MMAC1) mutations are frequent in primary glioblastomas (de novo) but not in secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1998;57(7):684-689.
64. Karakas B, Bachman KE, Park BH. Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers. *Br J Cancer*. 2006;94(4):455-459.
65. Samuels Y, Velculescu VE. Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. *Cell Cycle*. 2004;3(10):1221-1224.
66. Broderick DK, Di C, Parrett TJ, et al. Mutations of PIK3CA in anaplastic oligodendrogliomas, high-grade astrocytomas, and medulloblastomas. *Cancer Res*. 2004;64(15):5048-5050.
67. Hartmann C, Bartels G, Gehlhaar C, Holtkamp N, von Deimling A. PIK3CA mutations in glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol*. 2005;109(6):639-642.
68. Knobbe CB, Trampe-Kieslich A, Reifenberger G. Genetic alteration and expression of the phosphoinositol-3-kinase/Akt pathway genes PIK3CA and PIKE in human glioblastomas. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2005;31(5):486-490.
69. Mueller W, Mizoguchi M, Silen E, D'Amore K, Nutt CL, Louis DN. Mutations of the PIK3CA gene are rare in human glioblastoma. *Acta Neuropathol*. 2005;109(6):654-655.
70. Kita D, Yonekawa Y, Weller M, Ohgaki H. PIK3CA alterations in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol*. 2007;113(3):295-302.
71. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*. 1999;13(12):1501-1512.
72. Reifenberger G, Reifenberger J, Ichimura K, Meltzer PS, Collins VP. Amplification of multiple genes from chromosomal region 12q13-14 in human malignant gliomas: preliminary mapping of the amplicons shows preferential involvement of CDK4, SAS, and MDM2. *Cancer Res*. 1994;54(16):4299-4303.
73. Ichimura K, Schmidt EE, Goike HM, Collins VP. Human glioblastomas with no alterations of the CDKN2A (p16INK4A, MTS1) and CDK4 genes have frequent mutations of the retinoblastoma gene. *Oncogene*. 1996;13(5):1065-1072.

74. Riemenschneider MJ, Reifenberger G. Molecular neuropathology of gliomas. *Int J Mol Sci.* 2009;10(1):184-212.
75. Schmidt EE, Ichimura K, Reifenberger G, Collins VP. CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion or CDK4 amplification occurs in the majority of glioblastomas. *Cancer Res.* 1994;54(24):6321-6324.
76. Biernat W, Tohma Y, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Alterations of cell cycle regulatory genes in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol.* 1997;94(4):303-309.
77. Nakamura M, Watanabe T, Klangby U, et al. p14ARF deletion and methylation in genetic pathways to glioblastomas. *Brain Pathol.* 2001;11(2):159-168.
78. Nakamura M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Promoter hypermethylation of the RB1 gene in glioblastomas. *Lab Invest.* 2001;81(1):77-82.
79. Fujisawa H, Reis RM, Nakamura M, et al. Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas. *Lab Invest.* 2000;80(1):65-72.
80. Rasheed BK, McLendon RE, Friedman HS, et al. Chromosome 10 deletion mapping in human gliomas: a common deletion region in 10q25. *Oncogene.* 1995;10(11):2243-2246.
81. Ichimura K, Schmidt EE, Miyakawa A, Goike HM, Collins VP. Distinct patterns of deletion on 10p and 10q suggest involvement of multiple tumor suppressor genes in the development of astrocytic gliomas of different malignancy grades. *Genes Chromosomes Cancer.* 1998;22(1):9-15.
82. Fults D, Pedone CA, Thompson GE, et al. Microsatellite deletion mapping on chromosome 10q and mutation analysis of MMAC1, FAS, and MXI1 in human glioblastoma multiforme. *Int J Oncol.* 1998;12(4):905-910.
83. Riemenschneider MJ, Jeuken JW, Wesseling P, Reifenberger G. Molecular diagnostics of gliomas: state of the art. *Acta Neuropathol.* 2010;120(5):567-584.
84. Gerson SL. MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(4):296-307.
85. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med.* 2000;343(19):1350-1354.
86. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352(10):997-1003.
87. Herrlinger U, Rieger J, Koch D, et al. Phase II trial of lomustine plus temozolomide chemotherapy in addition to radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma: UKT-03. *J Clin Oncol.* 2006;24(27):4412-4417.
88. Yan H, Parsons DW, Jin G, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med.* 2009;360(8):765-773.
89. Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science.* 2008;321(5897):1807-1812.
90. Capper D, Zentgraf H, Balss J, Hartmann C, von Deimling A. Monoclonal antibody specific for IDH1 R132H mutation. *Acta Neuropathol.* 2009;118(5):599-601.
91. Cairns RA, Mak TW. Oncogenic isocitrate dehydrogenase mutations: mechanisms, models, and clinical opportunities. *Cancer Discov.* 2013;3(7):730-741.

BIBLIOGRAFÍA

92. Losman JA, Kaelin WG. What a difference a hydroxyl makes: mutant IDH, (R)-2-hydroxyglutarate, and cancer. *Genes Dev.* 2013;27(8):836-852.
93. Heaphy CM, de Wilde RF, Jiao Y, et al. Altered telomeres in tumors with ATRX and DAXX mutations. *Science.* 2011;333(6041):425.
94. Liu XY, Gerges N, Korshunov A, et al. Frequent ATRX mutations and loss of expression in adult diffuse astrocytic tumors carrying IDH1/IDH2 and TP53 mutations. *Acta Neuropathol.* 2012;124(5):615-625.
95. Louis DN, Perry A, Burger P, et al. International Society Of Neuropathology--Haarlem consensus guidelines for nervous system tumor classification and grading. *Brain Pathol.* 2014;24(5):429-435.
96. Network CGAR. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature.* 2008;455(7216):1061-1068.
97. Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell.* 2010;17(1):98-110.
98. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(6):442-454.
99. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100(1):57-70.
100. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-674.
101. El Habr EA, Adamopoulos C, Levidou G, Sietta AA, Korkolopoulou P, Piperi C. The Clinical and Prognostic Significance of Activated AKT-mTOR Pathway in Human Astrocytomas. *Neurol Res Int.* 2012;2012:454957.
102. Ruvinsky I, Meyuhas O. Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *Trends Biochem Sci.* 2006;31(6):342-348.
103. Pelletier J, Sonenberg N. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature.* 1988;334(6180):320-325.
104. López-Lastra M, Rivas A, Barría MI. Protein synthesis in eukaryotes: the growing biological relevance of cap-independent translation initiation. *Biol Res.* 2005;38(2-3):121-146.
105. Joshi B, Cameron A, Jagus R. Characterization of mammalian eIF4E-family members. *Eur J Biochem.* 2004;271(11):2189-2203.
106. Castellvi J, Garcia A, Rojo F, et al. Phosphorylated 4E binding protein 1: a hallmark of cell signaling that correlates with survival in ovarian cancer. *Cancer.* 2006;107(8):1801-1811.
107. Rojo F, Najera L, Lirola J, et al. 4E-binding protein 1, a cell signaling hallmark in breast cancer that correlates with pathologic grade and prognosis. *Clin Cancer Res.* 2007;13(1):81-89.
108. Castellvi J, Garcia A, Ruiz-Marcellan C, et al. Cell signaling in endometrial carcinoma: phosphorylated 4E-binding protein-1 expression in endometrial cancer correlates with aggressive tumors and prognosis. *Hum Pathol.* 2009;40(10):1418-1426.
109. Chamberlain MC. Salvage therapy with BRAF inhibitors for recurrent pleomorphic xanthoastrocytoma: a retrospective case series. *J Neurooncol.* 2013;114(2):237-240.
110. Lee EQ, Ruland S, LeBoeuf NR, Wen PY, Santagata S. Successful Treatment of a Progressive BRAF V600E-Mutated Anaplastic Pleomorphic Xanthoastrocytoma With Vemurafenib Monotherapy. *J Clin Oncol.* 2014.

111. Yu K, Toral-Barza L, Shi C, Zhang WG, Zask A. Response and determinants of cancer cell susceptibility to PI3K inhibitors: combined targeting of PI3K and Mek1 as an effective anticancer strategy. *Cancer Biol Ther.* 2008;7(2):307-315.
112. Hoeflich KP, O'Brien C, Boyd Z, et al. In vivo antitumor activity of MEK and phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors in basal-like breast cancer models. *Clin Cancer Res.* 2009;15(14):4649-4664.
113. Wee S, Jagani Z, Xiang KX, et al. PI3K pathway activation mediates resistance to MEK inhibitors in KRAS mutant cancers. *Cancer Res.* 2009;69(10):4286-4293.
114. Armengol G, Rojo F, Castellví J, et al. 4E-binding protein 1: a key molecular "funnel factor" in human cancer with clinical implications. *Cancer Res.* 2007;67(16):7551-7555.
115. Korkolopoulou P, Levidou G, El-Habr EA, et al. Phosphorylated 4E-binding protein 1 (p-4E-BP1): a novel prognostic marker in human astrocytomas. *Histopathology.* 2012;61(2):293-305.
116. Ermoian RP, Kaprealian T, Lamborn KR, et al. Signal transduction molecules in gliomas of all grades. *J Neurooncol.* 2009;91(1):19-26.
117. Riemenschneider MJ, Betensky RA, Pasedag SM, Louis DN. AKT activation in human glioblastomas enhances proliferation via TSC2 and S6 kinase signaling. *Cancer Res.* 2006;66(11):5618-5623.
118. Carroll M, Borden KL. The oncogene eIF4E: using biochemical insights to target cancer. *J Interferon Cytokine Res.* 2013;33(5):227-238.
119. Pettersson F, Del Rincon SV, Miller WH. Eukaryotic translation initiation factor 4E as a novel therapeutic target in hematological malignancies and beyond. *Expert Opin Ther Targets.* 2014;18(9):1035-1048.
120. De Benedetti A, Graff JR. eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases. *Oncogene.* 2004;23(18):3189-3199.
121. Crew JP, Fuggle S, Bicknell R, Cranston DW, de Benedetti A, Harris AL. Eukaryotic initiation factor-4E in superficial and muscle invasive bladder cancer and its correlation with vascular endothelial growth factor expression and tumour progression. *Br J Cancer.* 2000;82(1):161-166.
122. Graff JR, Konicek BW, Lynch RL, et al. eIF4E activation is commonly elevated in advanced human prostate cancers and significantly related to reduced patient survival. *Cancer Res.* 2009;69(9):3866-3873.
123. Furic L, Rong L, Larsson O, et al. eIF4E phosphorylation promotes tumorigenesis and is associated with prostate cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(32):14134-14139.
124. Rosenwald IB, Chen JJ, Wang S, Savas L, London IM, Pullman J. Upregulation of protein synthesis initiation factor eIF-4E is an early event during colon carcinogenesis. *Oncogene.* 1999;18(15):2507-2517.
125. Seki N, Takasu T, Mandai K, et al. Expression of eukaryotic initiation factor 4E in atypical adenomatous hyperplasia and adenocarcinoma of the human peripheral lung. *Clin Cancer Res.* 2002;8(10):3046-3053.
126. al M-GJe. A model for angiogenesis in HPV-mediated cervical cancer. Vol 2. *J Appl Res*2002:63-73.
127. Gu X, Jones L, Lowery-Norberg M, Fowler M. Expression of eukaryotic initiation factor 4E in astrocytic tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2005;13(2):178-183.

BIBLIOGRAFÍA

128. Haydon MS, Googe JD, Sorrells DS, Ghali GE, Li BD. Progression of eIF4e gene amplification and overexpression in benign and malignant tumors of the head and neck. *Cancer*. 2000;88(12):2803-2810.
129. Culjkovic B, Topisirovic I, Borden KL. Controlling gene expression through RNA regulons: the role of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E. *Cell Cycle*. 2007;6(1):65-69.
130. Hou J, Lam F, Proud C, Wang S. Targeting Mnks for cancer therapy. *Oncotarget*. 2012;3(2):118-131.
131. Bhat M, Robichaud N, Hulea L, Sonenberg N, Pelletier J, Topisirovic I. Targeting the translation machinery in cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2015;14(4):261-278.
132. Fan S, Ramalingam SS, Kauh J, Xu Z, Khuri FR, Sun SY. Phosphorylated eukaryotic translation initiation factor 4 (eIF4E) is elevated in human cancer tissues. *Cancer Biol Ther*. 2009;8(15):1463-1469.
133. Yang J, Liao D, Wang Z, Liu F, Wu G. Mammalian target of rapamycin signaling pathway contributes to glioma progression and patients' prognosis. *J Surg Res*. 2011;168(1):97-102.
134. Annovazzi L, Mellai M, Caldera V, Valente G, Tessitore L, Schiffer D. mTOR, S6 and AKT expression in relation to proliferation and apoptosis/autophagy in glioma. *Anticancer Res*. 2009;29(8):3087-3094.
135. Li XY, Zhang LQ, Zhang XG, et al. Association between AKT/mTOR signalling pathway and malignancy grade of human gliomas. *J Neurooncol*. 2011;103(3):453-458.
136. Chakravarti A, Zhai G, Suzuki Y, et al. The prognostic significance of phosphatidylinositol 3-kinase pathway activation in human gliomas. *J Clin Oncol*. 2004;22(10):1926-1933.
137. Iwenofu OH, Lackman RD, Staddon AP, Goodwin DG, Haupt HM, Brooks JS. Phospho-S6 ribosomal protein: a potential new predictive sarcoma marker for targeted mTOR therapy. *Mod Pathol*. 2008;21(3):231-237.
138. Mizoguchi M, Betensky RA, Batchelor TT, Bernay DC, Louis DN, Nutt CL. Activation of STAT3, MAPK, and AKT in malignant astrocytic gliomas: correlation with EGFR status, tumor grade, and survival. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006;65(12):1181-1188.
139. Tysnes BB, Haugland HK, Bjerkvig R. Epidermal growth factor and laminin receptors contribute to migratory and invasive properties of gliomas. *Invasion Metastasis*. 1997;17(5):270-280.
140. Lund-Johansen M, Bjerkvig R, Humphrey PA, Bigner SH, Bigner DD, Laerum OD. Effect of epidermal growth factor on glioma cell growth, migration, and invasion in vitro. *Cancer Res*. 1990;50(18):6039-6044.
141. Heimberger AB, Suki D, Yang D, Shi W, Aldape K. The natural history of EGFR and EGFRvIII in glioblastoma patients. *J Transl Med*. 2005;3:38.
142. Mawrin C, Diete S, Treuheit T, et al. Prognostic relevance of MAPK expression in glioblastoma multiforme. *Int J Oncol*. 2003;23(3):641-648.
143. Pfister S, Janzarik WG, Remke M, et al. BRAF gene duplication constitutes a mechanism of MAPK pathway activation in low-grade astrocytomas. *J Clin Invest*. 2008;118(5):1739-1749.
144. Sievert AJ, Jackson EM, Gai X, et al. Duplication of 7q34 in pediatric low-grade astrocytomas detected by high-density single-nucleotide polymorphism-based genotype arrays results in a novel BRAF fusion gene. *Brain Pathol*. 2009;19(3):449-458.

145. Schindler G, Capper D, Meyer J, et al. Analysis of BRAF V600E mutation in 1,320 nervous system tumors reveals high mutation frequencies in pleomorphic xanthoastrocytoma, ganglioglioma and extra-cerebellar pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathol.* 2011;121(3):397-405.
146. Albert L, Karsy M, Murali R, Jhanwar-Uniyal M. Inhibition of mTOR Activates the MAPK Pathway in Glioblastoma Multiforme. *Cancer Genomics Proteomics.* 2009;6(5):255-261.
147. Zhou YH, Tan F, Hess KR, Yung WK. The expression of PAX6, PTEN, vascular endothelial growth factor, and epidermal growth factor receptor in gliomas: relationship to tumor grade and survival. *Clin Cancer Res.* 2003;9(9):3369-3375.
148. Pelloski CE, Lin E, Zhang L, et al. Prognostic associations of activated mitogen-activated protein kinase and Akt pathways in glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 2006;12(13):3935-3941.
149. Panigrahi AR, Pinder SE, Chan SY, Paish EC, Robertson JF, Ellis IO. The role of PTEN and its signalling pathways, including AKT, in breast cancer; an assessment of relationships with other prognostic factors and with outcome. *J Pathol.* 2004;204(1):93-100.
150. Cavalla P, Dutto A, Piva R, Richiardi P, Grosso R, Schiffer D. Cyclin D1 expression in gliomas. *Acta Neuropathol.* 1998;95(2):131-135.
151. Chakrabarty A, Bridges LR, Gray S. Cyclin D1 in astrocytic tumours: an immunohistochemical study. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1996;22(4):311-316.
152. Sallinen SL, Sallinen PK, Kononen JT, et al. Cyclin D1 expression in astrocytomas is associated with cell proliferation activity and patient prognosis. *J Pathol.* 1999;188(3):289-293.
153. Johannessen AL, Torp SH. The clinical value of Ki-67/MIB-1 labeling index in human astrocytomas. *Pathol Oncol Res.* 2006;12(3):143-147.
154. Hsu DW, Louis DN, Efird JT, Hedley-Whyte ET. Use of MIB-1 (Ki-67) immunoreactivity in differentiating grade II and grade III gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1997;56(8):857-865.
155. Eneström S, Vavruch L, Frånlund B, Nordenskjöld B. Ki-67 antigen expression as a prognostic factor in primary and recurrent astrocytomas. *Neurochirurgie.* 1998;44(1):25-30.
156. Pekny M, Wilhelmsson U, Pekna M. The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. *Neurosci Lett.* 2014;565:30-38.
157. Codeluppi S, Svensson CI, Hefferan MP, et al. The Rheb-mTOR pathway is upregulated in reactive astrocytes of the injured spinal cord. *J Neurosci.* 2009;29(4):1093-1104.
158. Sosunov AA, Wu X, McGovern RA, et al. The mTOR pathway is activated in glial cells in mesial temporal sclerosis. *Epilepsia.* 2012;53 Suppl 1:78-86.
159. Roy Choudhury G, Ryou MG, Poteet E, et al. Involvement of p38 MAPK in reactive astrogliosis induced by ischemic stroke. *Brain Res.* 2014;1551:45-58.
160. .
161. Grzmil M, Huber RM, Hess D, et al. MNK1 pathway activity maintains protein synthesis in rapalog-treated gliomas. *J Clin Invest.* 2014;124(2):742-754.
162. Graff JR, Konicek BW, Vincent TM, et al. Therapeutic suppression of translation initiation factor eIF4E expression reduces tumor growth without toxicity. *J Clin Invest.* 2007;117(9):2638-2648.

163. Hong DS, Kurzrock R, Oh Y, et al. A phase 1 dose escalation, pharmacokinetic, and pharmacodynamic evaluation of eIF-4E antisense oligonucleotide LY2275796 in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res.* 2011;17(20):6582-6591.
164. Assouline S, Culjkovic B, Cocolakis E, et al. Molecular targeting of the oncogene eIF4E in acute myeloid leukemia (AML): a proof-of-principle clinical trial with ribavirin. *Blood.* 2009;114(2):257-260.
165. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352(10):987-996.
166. Ramon Y Cajal S, De Mattos-Arruda L, Sonenberg N, Cortes J, Peg V. The intra-tumor heterogeneity of cell signaling factors in breast cancer: p4E-BP1 and peIF4E are diffusely expressed and are real potential targets. *Clin Transl Oncol.* 2014;16(11):937-941.
167. Koh J, Cho H, Kim H, et al. IDH2 mutation in gliomas including novel mutation. *Neuropathology.* 2014.

AGRADECIMIENTOS

Qué bien tener este espacio para agradecer a tanta gente la ayuda y el apoyo que he encontrado durante estos años, no sólo en la tesis, si no en general, en lo profesional y en lo personal.

Gracias Santiago, desde el principio me apoyaste para que hiciera lo que quería. Gracias por creer e insistir en que sacaríamos esto adelante. Joan Carles, que tuviste que hacer una inmersión molecular acelerada! Gracias por el apoyo profesional y moral de cada día. Y Arantxa, que empezamos juntas esta aventura cuando yo no sabía nada de nada, gracias por todo lo que me enseñaste y la confianza que tuviste en mí.

A Lirola, Nuria, Pere, Helena, Natalia, Carmen, y a todos los patólogos con los que me he formado, gracias por todo. Y a Marga y Berta, por ser tan majas y por lo fácil que es trabajar con vosotras. A Javi, por su gran ayuda y su buen humor.

Al ser de fuera se crean unos lazos especiales con la gente con la que se comparte el día a día, Irene, Sandra, Mayte, Maru, Alejandra, Jessica! Esto no sería lo mismo sin vosotras. Y Silvia, aunque estés lejos, una coR siempre será una coR. Y a Chisús y Fran, por la parte consorte y con suerte que os toca. Y a Cris, que ya es parte de la familia.

Teresa y Rosa! Sabéis que estamos aquí por todo el trabajo que hay detrás y que habéis hecho posible vosotras. Gracias por la sonrisa a pesar de que pidiera y pidiera cosas y más cosas.

A todas esas personas que me ayudan con las infinitas dudas, estén cerca o lejos, con las que tanto he aprendido y aprendo: Clayton, Craig, Istvan, Safa, Andrew, Teresa, Ellen, Montse. Gracias por vuestra generosidad.

A Fran, Esteban y Marta, Cristina y Raquel, Xavi, Jordi, Ángel, Manu, Francina, Joan, trabajar con vosotros es fácil y divertido, gracias!

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y a mi hermano, gracias por haber estado siempre ahí y haberme dado lo mejor. A mi familia, que es muy grande, os siento cerca aunque estéis lejos. Vicente, gracias por estar a mi lado cada día, cuidarme y apoyarme tanto cuando lo necesito; gracias por haber emprendido juntos esta aventura y por Guille y Hugo, que lo son todo.