



Universidad Nacional de Rosario
Facultad de Ciencias Médicas



GMD Facultad Cs. Médicas
Biblioteca

TDM 2883

Grupo Gamma
Laboratorio de Medicina Genómica
Centro de Diagnóstico Patológico S.R.L.

Caracterización molecular de gliomas e identificación de nuevos biomarcadores pronósticos y predictivos

Autor: **Maria Fernanda Ruiz**. Médica Anatomopatóloga.

Director: **Germán R. Perez**. Bioquímico. Doctor en Ciencias Biológicas.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	<i>i</i>
PUBLICACIONES, PRESENTACIONES A CONGRESOS Y PREMIOS	<i>ii</i>
RESUMEN	<i>iv</i>
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	<i>v</i>
TABLAS Y FIGURAS	<i>vii</i>
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. <i>Características histológicas de los gliomas</i>	1
1.2. <i>Clasificación de los gliomas</i>	2
1.3. <i>Alteraciones moleculares y su relación con la gliomagénesis</i>	7
1.4. <i>Actualización en la clasificación de los gliomas</i>	8
1.5. <i>Acciones terapéuticas en el manejo de los gliomas</i>	10
1.6. <i>Alteraciones somáticas en el glioblastoma</i>	13
1.7. <i>Alteraciones en la vía RTK/RAS/PI3K</i>	14
1.8. <i>Alteraciones en la vía p53</i>	17
1.9. <i>Alteraciones en la vía Rb</i>	18
1.10. <i>Biomarcadores moleculares pronósticos y predictivos en gliomas</i>	18
2. DESARROLLO	21
2.1. <i>Diseño general del estudio</i>	21
2.2. <i>Consideraciones éticas</i>	22
2.3. <i>Procedimientos y ensayos</i>	22
2.3.1. <i>Preparación de la muestra</i>	22
2.3.2. <i>Estudios histológicos</i>	23
2.3.3. <i>Estudios inmunohistoquímicos</i>	24
2.3.4. <i>Estudios moleculares</i>	26
2.4. <i>Análisis estadístico</i>	30
3. RESULTADOS	31
3.1. <i>Características de los pacientes</i>	31

3.2. Biomarcadores y reclasificación de los gliomas según OMS 2016	31
3.3. Alteraciones moleculares en los genes relacionados a la gliomagénesis	46
3.3.1. Análisis del pMGMT	46
3.3.2. Análisis del gen PTEN	54
3.3.3. Análisis del gen EGFR	64
3.3.4. Análisis de los genes CDKN2A/B	70
3.3.5. Análisis del gen PDGFRA	75
3.3.6. Análisis de los genes CDK4 y MDM2, y el MicroRNA 26a-2 (MIR26A2)	79
3.3.7. Análisis del gen NFKBIA	88
3.3.8. Análisis del gen TP53	91
4. DISCUSIÓN	93
4.1. Características de los pacientes	93
4.2. Biomarcadores y reclasificación de los gliomas según OMS 2016	94
4.3. Alteraciones moleculares en los genes relacionados a la gliomagénesis	98
4.4. Limitaciones del estudio	109
4.5. Perspectivas futuras	111
5. CONCLUSIÓN	113
6. BIBLIOGRAFÍA	115

AGRADECIMIENTOS

A mi director, Germán, por su guía constante, su compromiso y su confianza en mi trabajo. Su orientación científica y humana fueron fundamentales para el desarrollo y la culminación de esta investigación.

A los Servicios de Anatomía Patológica de Grupo Gamma y del Hospital de Emergencias “Dr. Clemente Álvarez”, por su colaboración, disposición y el apoyo técnico brindado durante el desarrollo de este trabajo.

A Sebastian Brandner, por su valiosa mentoría, su tiempo y sus consejos, que enriquecieron tanto mi formación como el desarrollo de esta investigación.

A Javier, por su comprensión, paciencia y amor en los momentos de mayor esfuerzo. Y a Lisa, mi hija, por ser fuente inagotable de alegría, inspiración y ternura.

A todos ellos, mi más profundo agradecimiento por acompañarme, sostenerme y contribuir de manera significativa a este logro.

PUBLICACIONES, PRESENTACIONES A CONGRESOS Y PREMIOS

- **Ruiz MF**, Gennaro MV, Bastone LC, Godoy AR, Torruella M, Perez GR. Molecular biomarkers and integrated pathological diagnosis in the reclassification of gliomas. *Molecular and Clinical Oncology*. 2021;15(2):150. DOI: 10.3892/mco.2021.2312.
- **Ruiz, MF**; Perez, GR; Godoy, A; Torruella, M; Gennaro, MV. Enfoque integrado en el diagnóstico de gliomas. *Anuario científico Hospital de Emergencias “Dr. Clemente Álvarez”*. **2017**; Vol 2 (2):65-72. (ISSN:2545–8035).
- L.C. Bastone, **M.F. Ruiz**, M.V. Gennaro, A. Godoy, J. Acosta, G.R. Perez. *Biomarcadores moleculares en gliomas: un avance en el diagnóstico preciso*. *Presentación oral*. IV Jornadas Regionales de Genética. Organizada por la Regional Litoral de la Sociedad Argentina de Genética. 23 - 24 Septiembre 2024. Rosario (Argentina). Libro de resúmenes p144.
- Bastone LC, **Ruiz MF**, Gennaro MV, Acosta J, Godoy A, Perez GR. *Diagnóstico integrado en gliomas: nuevos biomarcadores moleculares para una mejor caracterización tumoral*. *Presentación oral*. 74º Congreso Argentino de Bioquímica 2023. 13-16 Junio 2023. CABA (Argentina). Libro de resúmenes p144.
- Ruiz MF, Perez GR, Gennaro MV, Bastone L, Godoy AR, Torruella M. *Relevancia pronóstica y predictiva de delecciones en el gen cdkn2a/b en gliomas difusos astrocitarios*. *Presentación oral*. XLV Congreso Argentino de Genética. 24-26 de Septiembre de 2020 (modalidad virtual). Journal of Basic and Applied Genetics I Vol XXXI Suppl. (1): 88-96; September 2020
- **Ruiz MF**, Perez GR, Gennaro MV, Bastone L, Godoy AR, Torruella M. *Impacto del Informe integrado en la clasificación diagnóstica de gliomas*. *Presentación oral*. XVIII Día de Ciencias del Hospital de Emergencias Dr. Clemente Álvarez. 19 de Noviembre 2019. Rosario (Argentina).
- **Ruiz MF**, Perez GR, Gennaro MV, Bastone L, Rocha L, Godoy AR, Torruella M. *Diagnóstico Integrado en Gliomas: Biomarcadores moleculares y el Avance en el Pronóstico y Respuesta a la Terapia*. *Presentación oral*. XXIV Congreso Nacional e Internacional de Oncología Clínica. 6 - 8 de Noviembre 2019. Rosario (Argentina).

- Perez GR, **Ruiz MF**, Gennaro MV, Bastone L, Godoy AR, Torruella M. *Perfil de la pérdida de heterocigosidad en la región 10q en gliomas de adultos. Presentación oral.* 3º Congreso Latinoamericano de Farmacogenómica y Medicina Personalizada. 24-26 de Octubre 2019. Cusco (Perú). Libro de resúmenes.
- **Ruiz MF**, Perez GR, Gennaro MV, Bastone L, Godoy AR, Torruella M. *Asociación de la pérdida de heterocigosidad del 10q y estado de metilación del pMGMT en gliomas de adultos. Presentación oral.* XVII Congreso Latinoamericano de Genética, XLVII Congreso Argentino de Genética, LII Reunión Anual de la Sociedad de Genética de Chile, VI Congreso de la Sociedad Uruguaya de Genética, V Congreso Latinoamericano de Genética Humana y V Simposio Latinoamericano de Citogenética y Evolución (ALAG2019). 6-9 de Octubre 2019. Mendoza (Argentina). *Journal of Basic & Applied Genetics 2019;(Vol. XXX):S01:205 (E-ISNN: 1852-6322).*
- Perez GR.; **Ruiz MF**; Gennaro MV; Bastone L; Godoy A; Torruella M. Caracterización de Alteraciones Genéticas en Vías de Señalización para Potenciales Terapias en Glioblastomas Primarios: Estudio Preliminar. Presentación oral. 2º Congreso Latinoamericano de Farmacogenómica y Medicina Personalizada. 25-28 de Octubre 2017. Durango (México). Código: MDPE907.
- **Premio Mejor Póster.** *Diagnóstico Integrado en Gliomas: Biomarcadores moleculares y el Avance en el Pronóstico y Respuesta a la Terapia.* **Ruiz MF**, Perez GR, Gennaro MV, Bastone L, Rocha L, Godoy AR, Torruella M. XXIV Congreso Nacional e Internacional de Oncología Clínica. 6 - 8 de Noviembre 2019. Rosario (Argentina).
- **Segundo Premio “Dr Amílcar Ghilardi” - Día de Ciencias 2019.** *Impacto del Informe integrado en la clasificación diagnóstica de gliomas.* **Ruiz MF**, Perez GR, Gennaro MV, Bastone L, Godoy AR, Torruella M. XVIII Día de Ciencias del Hospital de Emergencias Dr. Clemente Álvarez. 19 de Noviembre 2019. Rosario (Argentina).

RESUMEN (500 PALABRAS)

Este trabajo de tesis se centra en la clasificación de los gliomas, tumores primarios del Sistema Nervioso Central, mediante un enfoque integrado que combina la histología tradicional con biomarcadores moleculares. La hipótesis principal sostiene que una caracterización molecular más detallada permitirá definir subgrupos de gliomas molecularmente homogéneos, lo que aportará información crucial sobre el pronóstico y la respuesta al tratamiento.

Los objetivos específicos incluyen: clasificar los gliomas utilizando biomarcadores ya establecidos (mutaciones en IDH1/2, codeleción 1p/19q); caracterizar alteraciones en genes clave como PDGFRA, EGFR, CDKN2A/B, PTEN, MGMT, CDK4, MDM2, NFKBIA y TP53; y evaluar el valor pronóstico y predictivo de estas alteraciones mediante el análisis de la supervivencia de los pacientes a dos años. La finalidad última es avanzar hacia una medicina de precisión que permita terapias más personalizadas y efectivas.

Esta tesis estudió 119 gliomas según los criterios de la OMS 2016, la cual modificó el diagnóstico en el 27% de los casos en comparación con la clasificación anterior. Esto demostró que la introducción de biomarcadores moleculares a la clasificación permite definir subgrupos homogéneos molecularmente con distinto pronóstico. Por ejemplo, los tumores IDH mutados mostraron mejor supervivencia global.

El análisis de alteraciones genéticas reveló que la delección de PTEN, la amplificación de EGFR y la delección de CDKN2A/B se asociaron de forma independiente con un peor pronóstico. Por otro lado, la metilación del promotor de MGMT se confirmó como un factor predictivo de mejor respuesta a la temozolomida, el fármaco estándar utilizado para el tratamiento. Además, se identificaron perfiles de riesgo combinados, donde la coexistencia de delección de PTEN y falta de metilación de MGMT definió el subgrupo con la peor supervivencia.

Estos hallazgos subrayan el valor pronóstico y predictivo de la caracterización molecular integrada en gliomas. Por último, validan la utilidad clínica de la caracterización molecular integrada para una estratificación precisa de los pacientes y el avance hacia terapias personalizadas.

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

5hmC: 5-hidroximetilcitosina

5mC: 5-metilcitosina

AIC: 5-aminoimidazol-4-carboxamida

array-CGH: Hibridación Genómica Comparativa basada en Arrays

ASaCTel: Agencia Santafesina de Ciencia, Tecnología e Innovación

ATRX: del inglés *Alpha Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-linked*

BER: reparación por escisión de bases (del inglés *Base Excision Repair*)

BHE: barrera hematoencefálica

DAB: diaminobenzidina

CBTRUS: del inglés *Central Brain Tumor Registry of the United States*

CD-1p/19q: codeleción 1p/19q

CDK: ciclinas dependientes de quinasa, del inglés *Cyclin-Dependent Kinase*

CDK4: del inglés *Cyclin-Dependent Kinase 4*

CDKN2A/B: del inglés *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A/B*

CGGA: Atlas chino del genoma del glioma (del inglés *Chinese Glioma Genome Atlas*)

cIMPACT-NOW: Consorcio para Informar Enfoques Moleculares y Prácticos para la Taxonomía de Tumores del SNC.

CNV: del inglés *copy number variation*

D2HG: D-2-hidroxiglutarato

EGFR: del inglés *Epidermal Growth Factor Receptor*

FDA: del inglés *Food and Drug Administration*

FISH: Hibridación Fluorescente *In Situ*

GFAP: Proteína Glio-fibrilar Ácida (del inglés *Glial fibrillary acidic protein*)

HIF: prolil hidroxilasas

ICGC: Consorcio Internacional del Genoma del Cáncer (del inglés *International Cancer Genome Consortium*)

IDH: isocitrato deshidrogenasa

IDHmut: IDH mutados

IDHwt: IDH no mutados o *wild-type*

IHQ: inmunohistoquímica

H&E: tinción hematoxilina y eosina

LOH: pérdida de heterocigosidad

LPO: del inglés *left probe oligonucleotide*

MDM2: del inglés *Mouse Double Minute 2 Homolog*

MGMT: metilguanina-ADN metiltransferasa

MLPA: Amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples (del inglés *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*)

MMR: reparación de desemparejamientos del ADN (del inglés *DNA mismatch repair*)

MS-MLPA: Amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples - metilación específica (del inglés *Methylation-specific - Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*)

MTIC: 5-(3-metil-1-triazeno)imidazol-4-carboxamida

NFKBIA: del inglés *Nuclear Factor Kappa B Inhibitor Alpha*

NF-κB: Factor Nuclear Kappa B

NOS: del inglés *not otherwise specified*

OMS: Organización Mundial de la Salud

OS: supervivencia global (del inglés *overall survival*)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa de punto final

PCV: Procarbazina, Lomustina, Vincristina

PDGFRA: del inglés *Platelet-Derived Growth Factor Receptor Alpha*

PIP2: fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato

PIP3: fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato

pMGMT: promotor del gen metilguanina-ADN metiltransferasa

PTEN: del inglés *Phosphatase and tensin homolog*

RPO: del inglés *right probe oligonucleotide*

RTK: Receptores Tirosina Quinasa (del inglés *Receptor Tyrosine Kinase*)

SNC: Sistema Nervioso Central

TCGA: Atlas del Genoma del Cáncer (del inglés *The Cancer Genome Atlas*)

TET: citocinas hidroxilasas

TK: tirosina quinasa

TKI: inhibidores de tirosina quinasa

TMZ: Temozolomida

TP53: del inglés *Tumor Protein 53*

TABLAS Y FIGURAS

TABLA 1. Características tumorales para cada grado histológico.

TABLA 2. Frecuencias de las mutaciones IDH1 e IDH2 en gliomas.

TABLA 3. Clasificación 2016 OMS de los gliomas y su grado histológico para las entidades más frecuentes.

TABLA 4. Tipo de alteraciones en glioblastoma de los genes relacionados a la vía RTK/RAS/PI3K.

TABLA 5. Tipo de alteraciones en glioblastoma de los genes relacionados a la vía p53.

TABLA 6. Clasificación 2007 OMS de los 119 gliomas estudiados.

TABLA 7. Clasificación 2016 OMS de los 119 gliomas estudiados.

TABLA 8. Clasificación 2016 OMS de los 119 gliomas, su grado histológico y número de casos.

TABLA 9. Datos de OS de la cohorte de 119 gliomas.

TABLA 10. Presencia de delección y estado de metilación (porcentaje) para el pMGMT en los 119 gliomas.

TABLA 11. Frecuencia de alteraciones en el gen PTEN en los 119 gliomas.

TABLA 12. Presencia de delección del gen PTEN en los 119 gliomas.

TABLA 13. Presencia de delección en los genes PTEN y MGMT en los 119 gliomas.

TABLA 14. Presencia de delección en el gen PTEN y estado de metilación del pMGMT en los 119 gliomas.

TABLA 15. Presencia de amplificación del gen EGFR y de EGFRvIII en los 119 gliomas.

TABLA 16. Frecuencia de alteraciones en el gen EGFR en los 119 gliomas.

TABLA 17. Frecuencia de alteraciones en los genes CDKN2A/B en los 119 gliomas.

TABLA 18. Presencia de delección de los genes CDKN2A/B en los 119 gliomas.

TABLA 19. Frecuencia de alteraciones en el gen PDGFRA en los 119 gliomas.

TABLA 20. Presencia de delección del gen PDGFRA en los 119 gliomas.

TABLA 21. Frecuencia de alteraciones en los genes CDK4, MDM2 y MIR26A2 en los 119 gliomas.

TABLA 22. Presencia de alteraciones de los genes CDK4, MDM2 y MIR26A2 en los 119 gliomas.

TABLA 23. Presencia de amplificación de MIR26A2 y delección del gen PTEN en los 119 gliomas.

TABLA 24. Frecuencia de alteraciones en el gen NFKB1A en los 119 gliomas.

TABLA 25. Presencia de delección del gen NFKB1A en los 119 gliomas.

TABLA 26. Frecuencia de alteraciones en el gen TP53 en los 119 gliomas.

TABLA 27. Presencia de delección del gen TP53 en los 119 gliomas.

Figura 1. Efectos celulares del D2HG en las células de glioma.

Figura 2. Mecanismo de formación de la CD-1p/19q en los gliomas.

Figura 3. Descripción general de genes alterados en la formación de los tipos tumorales específicos durante la gliomagénesis.

Figura 4. Algoritmo simplificado para la clasificación 2016 OMS de los gliomas.

Figura 5. A. Activación del profármaco TMZ y las alteraciones inducidas en la guanina y adenina. B. Mecanismo de reparación de las N-metilaciones del ADN inducidas por TMZ. C. Mecanismos de reparación de las O-metilaciones del ADN inducidas por TMZ.

Figura 6. Vías de transducción de señales canónicas y de supresión tumoral en glioblastomas clínicamente relevantes.

Figura 7. Etapas de la técnica de MLPA.

Figura 8. Etapas de la técnica de MS-MLPA.

Figura 9. Características histopatológicas de gliomas.

Figura 10. Reclasificación de los 119 gliomas de acuerdo con la clasificación 2016 de la OMS.

Figura 11. Probabilidad de supervivencia según la clasificación previa de la OMS (A) y la clasificación actualizada (B).

Figura 12. Probabilidad de supervivencia de los subgrupos tumorales según la clasificación de la OMS-2016 en base al grado tumoral y estado de IDH.

Figura 13. Probabilidad de supervivencia de los subgrupos tumorales en base a su reclasificación del grado tumoral según la OS del paciente.

Figura 14. Gráficas obtenidas para muestras de 3 glioblastomas IDHwt.

Figura 15. Probabilidad de supervivencia de los subgrupos tumorales según su estado IDH con respecto a la delección en el pMGMT.

Figura 16. Probabilidad de supervivencia de los subgrupos tumorales según su estado IDH con respecto a la metilación del pMGMT.

Figura 17. A. Probabilidad de supervivencia de los tumores según su estado IDH y grado con respecto a la delección en el pMGMT. B. Probabilidad de supervivencia de los subgrupos tumorales definidos según su estado IDH, grado y presencia de delección en el pMGMT.

Figura 18. Gráficas obtenidas para muestras de 2 glioblastomas IDHwt. A. tumor con delección en el gen PTEN. B. tumor sin delección en el gen PTEN.

Figura 19. Probabilidad de supervivencia de los tumores según la delección de los genes PTEN y MGMT.

Figura 20. Probabilidad de supervivencia de los tumores según la delección del gen PTEN y el estado de metilación del pMGMT.

Figura 21. Gráficas obtenidas para muestras de 2 glioblastomas IDHwt. A. tumor sin amplificación del gen EGFR. B. tumor con amplificación del gen EGFR y presencia de la EGFRvIII.

Figura 22. Probabilidad de supervivencia de los tumores según la amplificación del gen EGFR.

Figura 23. Probabilidad de supervivencia de los tumores según los subgrupos determinados por la amplificación del gen EGFR y presencia de la EGFRvIII.

Figura 24. Gráficas obtenidas para muestras de 2 glioblastomas IDHwt. A. tumor sin delección en los genes CDKN2A/B. B. tumor con delección en los genes CDKN2A/B.

Figura 25. Probabilidad de supervivencia de los tumores según la delección de los genes CDKN2A/B.

Figura 26. Probabilidad de supervivencia de los tumores según los subgrupos determinados por la delección homocigota o heterocigota de los genes CDKN2A/B.

Figura 27. Probabilidad de supervivencia de los tumores según la alteración del gen PDGFRA.

Figura 28. Probabilidad de supervivencia de los tumores según los subgrupos determinados por la delección o amplificación del gen PDGFRA.

Figura 29. Probabilidad de supervivencia de los tumores según los subgrupos determinados por la alteración en los genes CDK4 (A), MDM2 (B) y MIR26A2 (C).

Figura 30. Probabilidad de supervivencia de los tumores según los subgrupos determinados por la amplificación de MIR26A2 y la delección del gen PTEN (A) y cuando se agrupan según la OS (B).

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Características histológicas de los gliomas

Los gliomas son un grupo heterogéneo de tumores primarios del Sistema Nervioso Central (SNC) que se originan a partir de las células gliales, las cuales brindan soporte y protección a las neuronas. Estos tumores representan aproximadamente el 30% de todos los tumores cerebrales y son más frecuentes en adultos [1].

Los gliomas se clasifican en diferentes grados histológicos según su apariencia bajo el microscopio y sus características biológicas. Esta clasificación es fundamental para determinar la agresividad del tumor, el pronóstico del paciente y el enfoque terapéutico. La Organización Mundial de la Salud (OMS) establece una escala de grados (I a IV) basada en criterios histopatológicos: *celularidad* (número de células tumorales en relación con el tejido normal), *atipia nuclear* (grado de anormalidad en la forma y tamaño de los núcleos celulares), *actividad mitótica* (frecuencia de células mitóticas indicativa de proliferación celular), *proliferación vascular* (formación de nuevos vasos sanguíneos dentro del tumor) y *necrosis* (presencia de áreas de tejido muerto). El grado histológico se determina mediante el análisis microscópico de una muestra de tejido tumoral obtenida mediante biopsia o resección quirúrgica [2], [3]. Tradicionalmente, los grados de malignidad tumoral de la OMS para el SNC se escribían en números romanos. Sin embargo, actualmente la OMS ha hecho hincapié en enfoques más uniformes para la clasificación y gradación tumoral y ha favorecido el uso de números arábigos, como se hace actualmente para todos los demás sistemas orgánicos. Dadas estas consideraciones, los grados tumorales serán escritos en números arábigos [4]. La TABLA 1 describe las características tumorales para cada grado histológico según criterios de la OMS.

TABLA 1. Características tumorales para cada grado histológico.

Grado 1 (Bajo Grado)	Tumores bien diferenciados y de crecimiento lento. Baja celularidad y atipia nuclear mínima o ausente. No hay mitosis, proliferación vascular ni necrosis.
Grado 2 (Bajo Grado)	Tumores difusos con crecimiento infiltrativo. Mayor celularidad y atipia nuclear leve a moderada. Actividad mitótica baja o ausente. No hay proliferación vascular significativa ni necrosis.
Grado 3 (Alto Grado)	Tumores anaplásicos con mayor agresividad. Alta celularidad y atipia nuclear marcada. Actividad mitótica elevada. Puede haber proliferación vascular, pero no necrosis.
Grado 4 (Alto Grado)	Tumores altamente malignos y de crecimiento rápido. Celularidad muy alta y atipia nuclear severa. Actividad mitótica muy elevada. Presencia de proliferación vascular prominente y necrosis.

Por otro lado, los gliomas también pueden ser clasificados según su tipo celular en:

- **Oligodendroglioma:** se originan a partir de los oligodendrocitos (células gliales responsables de la producción de mielina en el SNC) y representan aproximadamente el 5-10% de todos los gliomas. Suelen ser más comunes en adultos jóvenes y de mediana edad. Presentan células con núcleos redondos y halos claros perinucleares ("*aspecto de huevo frito*") y una red vascular característica ("*patrón en panal de abeja*").
- **Astrocitoma:** se originan a partir de los astrocitos (células gliales que participan en el soporte estructural y metabólico de las neuronas) y son 25-40% de todos los gliomas. Pueden variar desde lesiones de bajo grado hasta tumores altamente agresivos. Presentan células con prolongaciones citoplasmáticas y núcleos irregulares.
- **Glioblastoma:** es el glioma más agresivo y el tumor cerebral primario más común en adultos. Representa aproximadamente el 50% de todos los gliomas. Presenta alta celularidad, atipia nuclear, mitosis frecuentes, proliferación vascular y necrosis [5].

1.2. Clasificación de los gliomas

En 2007, la OMS introdujo un enfoque más detallado y estandarizado para la clasificación de los gliomas, centrándose en la morfología celular, las características histológicas y el grado de malignidad. Así se dio lugar a los siguientes tipos y subtipos tumorales:

1. **Oligodendrogliomas**

- 1.1. **Oligodendroglioma difuso (Grado 2):** Tumores de crecimiento lento pero infiltrativo. Células con núcleos redondos y halo claro perinuclear ("aspecto de huevo frito"). Baja actividad mitótica. No hay proliferación vascular ni necrosis.
- 1.2. **Oligodendroglioma anaplásico (Grado 3):** Tumores anaplásicos con mayor agresividad. Mayor celularidad y atipia nuclear. Actividad mitótica elevada. Puede haber proliferación vascular, pero no necrosis.

2. **Astroцитomas**

- 2.1. **Astrocitoma pilocítico (Grado 1):** Tumores bien diferenciados y de crecimiento lento. Baja celularidad y atipia nuclear mínima. Ausencia de mitosis, proliferación vascular y necrosis.
 - 2.2. **Astrocitoma difuso (Grado 2):** Tumores infiltrativos con crecimiento lento pero progresivo. Mayor celularidad y atipia nuclear leve a moderada. Actividad mitótica baja o ausente. No hay proliferación vascular significativa ni necrosis.
 - 2.3. **Astrocitoma anaplásico (Grado 3):** Tumores anaplásicos con mayor agresividad. Alta celularidad y atipia nuclear marcada. Actividad mitótica elevada. Puede haber proliferación vascular, pero no necrosis.
3. **Glioblastoma (Grado 4):** Tumores altamente malignos y de crecimiento rápido. Celularidad muy alta y atipia nuclear severa. Actividad mitótica muy elevada. Presencia de proliferación vascular prominente y necrosis.

De todos ellos, el glioblastoma es el tumor más agresivo y letal con una mediana de supervivencia de 14,6 meses, principalmente debido a los efectos limitados de los agentes quimioterapéuticos posquirúrgicos convencionales y la radioterapia [6]. La falta de un tratamiento eficaz supone un problema médico de gran importancia [7]. Sin embargo, nuevos enfoques terapéuticos han mejorado la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes a grados variables [8] [9].

Aunque la clasificación OMS 2007 fue un avance significativo, presentaba limitaciones como la variabilidad inter-observadores y el pronóstico heterogéneo de algunos tumores con características histológicas similares [3] [10].

El conocimiento en la biología molecular del cáncer sigue aumentando con el tiempo. Se han identificado alteraciones citogenéticas y genéticas moleculares en los gliomas que pueden

aprovecharse para facilitar la clasificación del glioma, especialmente en casos que exhiben características histológicas inconclusas [11] [12] [13].

La **isocitrato deshidrogenasa** (IDH) es una enzima del ciclo de Krebs que conduce a la descarboxilación oxidativa de isocitrato a α -cetoglutarato generando NADPH a partir de NADP y presenta 5 isoenzimas [14] [15]. La **isoenzima IDH1** es NAD-dependiente, citosólica, y codificada por el gen IDH1 (cromosoma 2q34). La **isoenzima IDH2** es NADP-dependiente, mitocondrial y codificada por el gen IDH2 (cromosoma 15q26). En 2008, se identificó en glioblastoma una mutación heterocigota en el exón 4 del gen IDH1 que conducía al cambio de arginina por histidina en la posición 132 de la proteína (p.R132H) [16]. Posteriormente, se identificó la mutación análoga en la isoenzima IDH2: p.R172H [18]. Estas mutaciones fueron luego descritas en los otros tipos de gliomas [19].

Las mutaciones en IDH son universalmente sustituciones sin sentido y casi invariablemente son heterocigotas. Las mutaciones en IDH1 e IDH2 solo ocurren en residuos de arginina específicos en los sitios activos de estas enzimas: Arg132 para IDH1 y Arg172 para IDH2 [19]. La TABLA 2 muestra la frecuencia de mutaciones de IDH en gliomas. Los datos se representan como porcentaje del total de mutaciones de IDH1/2 en pacientes con gliomas según Yan et al y Hartmann et al [20-18].

TABLA 2. Frecuencias de las mutaciones IDH1 e IDH2 en gliomas [17] [20]			
GEN	MUTACIÓN*	CAMBIO AMINOACÍDICO	FRECUENCIA (%)
IDH1	c.395G>A	R132H	83.5 – 88.9
	c.394C>T	R132C	3.9 – 4.1
	c.394C>A	R132S	1.5 – 2.4
	c.394C>G	R132G	0.6 – 1.3
	c.395G>T	R132L	0.3 – 4.1
IDH2	c.515G>A	R172K	2.4 – 2.7
	c.515G>T	R172M	0.8 – 1.8
	c.514A>T	R172W	0.0 – 0.7
	c.514A>G	R172G	0.0 – 1.2

*las variantes están anotadas según el transcrito NM_001282386.1.

Estos son residuos conservados evolutivamente en el sitio activo de estas enzimas y participan en la unión del isocitrato en el bolsillo catalítico [21] [22]. En 2009, se produjo el descubrimiento revolucionario de que estas mutaciones confieren una actividad neomórfica de ganancia de función que reduce al α -cetoglutarato para producir **D-2-hidroxioglutarato**

(D2HG) consumiendo NADPH [23]. D2HG es un inhibidor competitivo de las dioxigenasas dependientes de α -cetoglutarato, incluidas las histonas desmetilasas, particularmente aquellas que contienen el dominio Jumonji [22] [24] [25]. D2HG desempeña un papel causal en la gliomagénesis y se lo considera un **oncometabolito**.

En la FIGURA 1 se esquematizan los efectos del D2HG en las células de gliomas. Las mutaciones IDH llevan a la célula a adquirir un patrón de hipermetilación global denominado **fenotipo G-CIMP**.

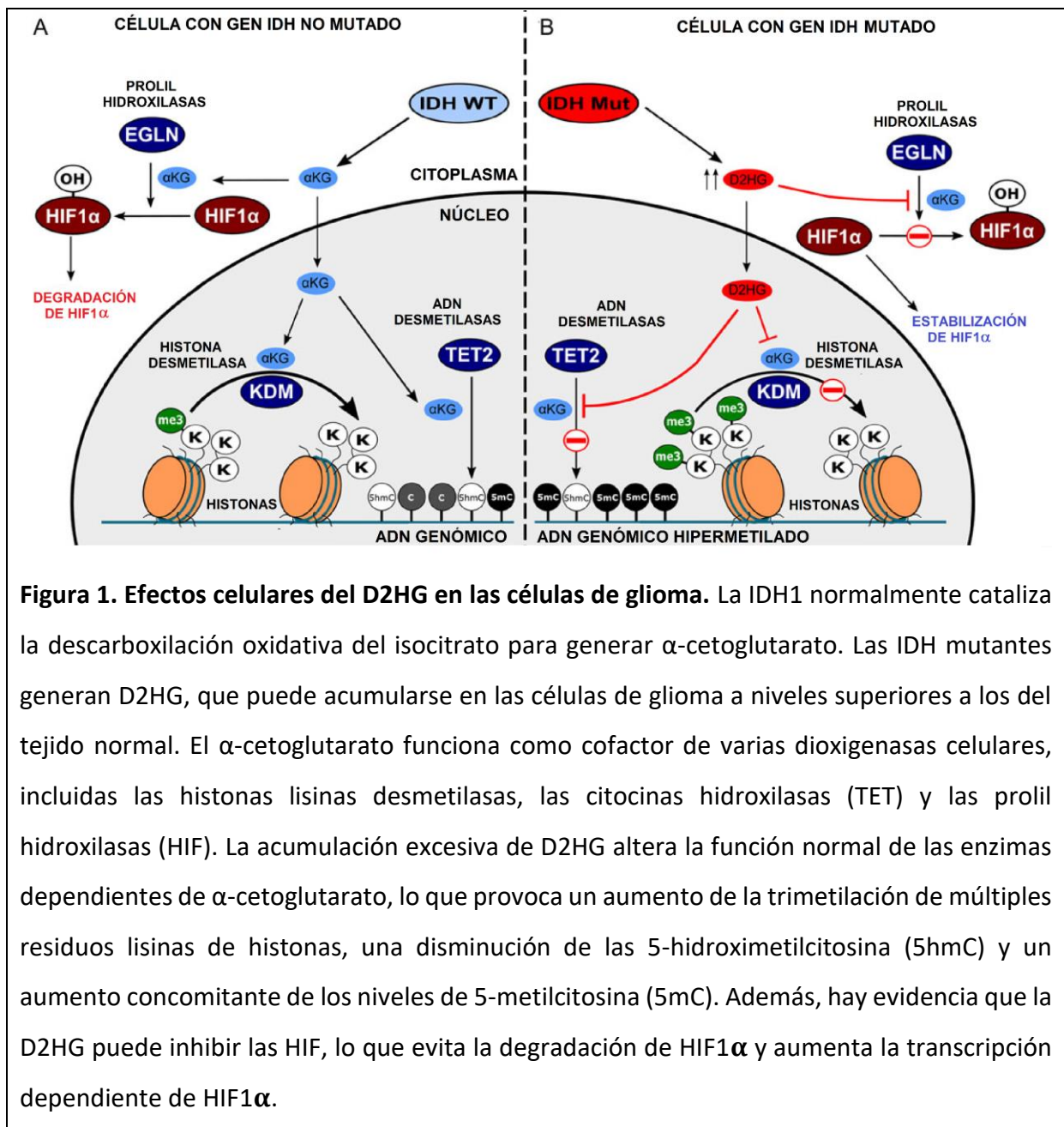
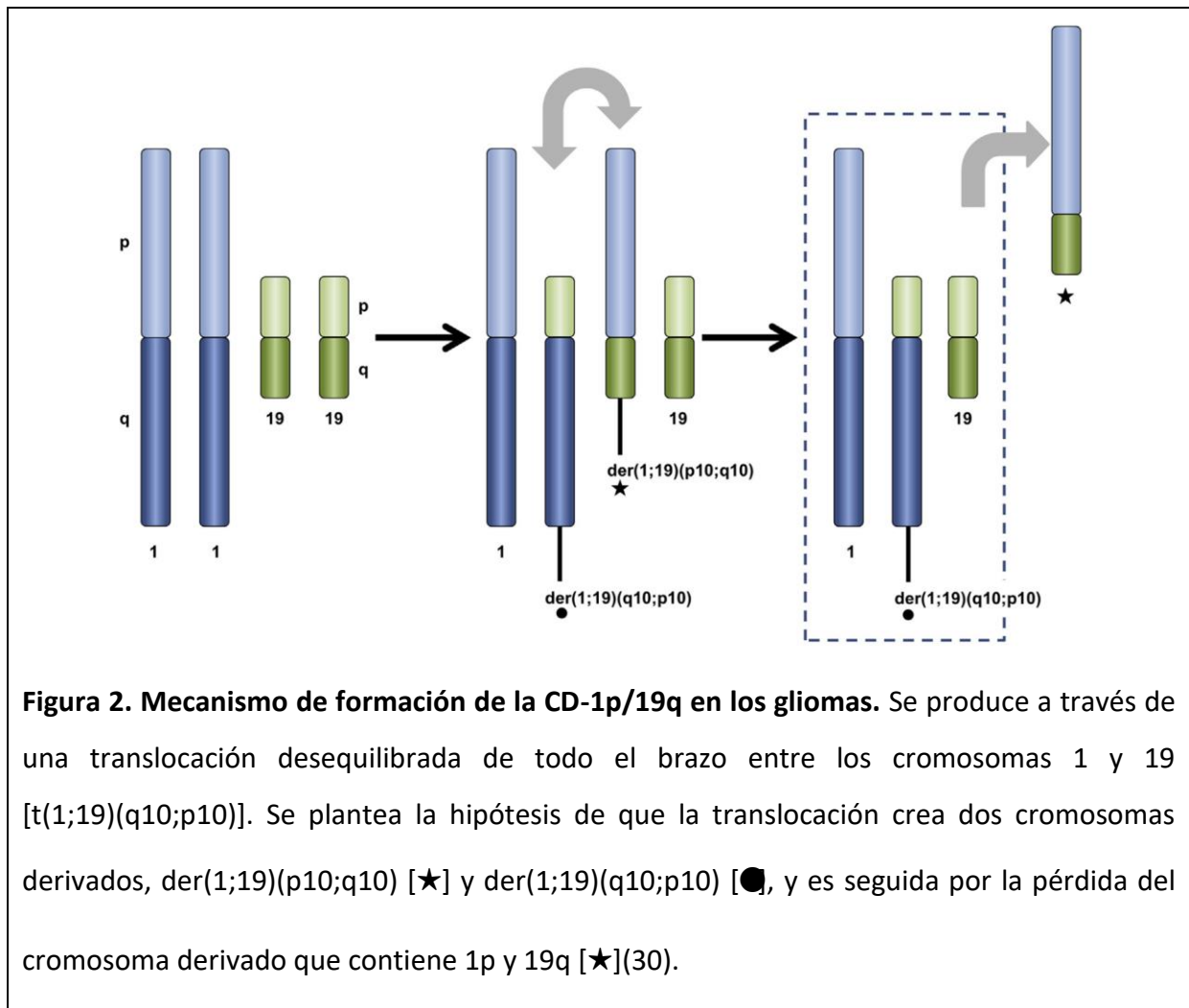


Figura 1. Efectos celulares del D2HG en las células de glioma. La IDH1 normalmente cataliza la descarboxilación oxidativa del isocitrato para generar α -cetoglutarato. Las IDH mutantes generan D2HG, que puede acumularse en las células de glioma a niveles superiores a los del tejido normal. El α -cetoglutarato funciona como cofactor de varias dioxigenasas celulares, incluidas las histonas lisinas desmetilasas, las citocinas hidroxilasas (TET) y las prolil hidroxilasas (HIF). La acumulación excesiva de D2HG altera la función normal de las enzimas dependientes de α -cetoglutarato, lo que provoca un aumento de la trimetilación de múltiples residuos lisinas de histonas, una disminución de las 5-hidroximetilcitosina (5hmC) y un aumento concomitante de los niveles de 5-metilcitosina (5mC). Además, hay evidencia que la D2HG puede inhibir las HIF, lo que evita la degradación de HIF1 α y aumenta la transcripción dependiente de HIF1 α .

Los gliomas IDH mutados (**IDHmut**) tienen un mejor pronóstico (progresan más lentamente con el tiempo) que aquellos IDH no mutados o *wild-type* (**IDHwt**) [26], lo que sugiere que se trata de formas biológicamente distintas de la enfermedad. Dentro de los gliomas astrocitarios (astrocitoma difuso, astrocitoma anaplásico y glioblastoma), un subgrupo presenta dicha mutación. Por otro lado, casi todos (60-94%) los gliomas oligodendrogiales (oligodendroglioma difuso y oligodendroglioma anaplásico) son IDHmut y, adicionalmente, presentan una codeleción de los brazos cromosómicos 1p y 19q [27] [28].

La codeleción 1p/19q (**CD-1p/19q**) es la pérdida conjunta de las regiones cromosómicas 1p y 19q que ocurre debido a una translocación desequilibrada entre los cromosomas 1 y 19, seguida de la pérdida de los segmentos cromosómicos afectados [29] (FIGURA 2). Estas regiones contienen genes supresores de tumores que regulan el ciclo celular y la apoptosis, por lo que su pérdida contribuye a la proliferación descontrolada de las células tumorales.



1.3. Alteraciones moleculares y su relación con la gliomagénesis

La mutación en IDH y la CD-1p/19q son eventos tempranos en la formación de gliomas y determinantes en la evolución del tumor [30]. Estas alteraciones tempranas establecen un entorno molecular que facilita la acumulación de mutaciones adicionales y la progresión del tumor. Se han identificado 3 vías para el desarrollo de un glioma (FIGURA 3):

- **vía 1:** inicia con la mutación en IDH seguida de mutación en los genes TP53 o ATRX (*Alpha Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-linked*), lo que da como resultado gliomas de linaje astrocítico. El 94% de los astrocitomas difusos y anaplásicos IDHmut sin CD-1p/19q y el 80% de los glioblastomas IDHmut poseen mutaciones de TP53 [10] [20]. Por otro lado, las mutaciones en el gen ATRX son frecuentes en astrocitomas difusos y anaplásicos IDHmut (67-73%), así como en glioblastomas IDHmut (57%) [31]. El 94% de los gliomas IDHmut y con mutaciones en el gen ATRX, presentan una mutación en el gen TP53. Las mutaciones en el gen ATRX están asociadas con el fenotipo de alargamiento alternativo de los telómeros, un mecanismo alternativo para mantener la longitud de los telómeros en tumores que no tienen actividad constitutiva de la telomerasa [32]. La presencia de proliferación vascular prominente, angiogénesis y necrosis evidencia la evolución del tumor a un glioblastoma secundario, el cual presenta las mismas anomalías genéticas que estos astrocitomas [32].
- **vía 2:** inicia con la mutación en IDH seguida de la CD-1p/19q dando lugar al desarrollo del linaje oligodendroglial. Estos tumores tienen un mecanismo para mantener la longitud de los telómeros mediante la presencia de mutaciones activadoras en el promotor del gen TERT que codifica para la transcriptasa inversa de la telomerasa [33]. El 96% de los oligodendrogliomas IDHmut y CD-1p/19q presentaron mutaciones en el promotor del gen TERT, formando parte de su firma molecular [10].
- **vía 3:** la célula precursora adquiere múltiples alteraciones genéticas complejas, pero carece de mutaciones en IDH y da como resultado gliomas IDHwt de linaje astrocítico (astrocitoma difuso y astrocitoma anaplásico) que se convierten muy tempranamente durante su desarrollo en el glioblastoma primario. Este tipo tumoral es heterogéneo genética y transcripcionalmente, observándose diversas alteraciones genéticas relacionadas a las vías de señalización intracelular RTK/RAS/PI3K, p53 y Rb que son necesarias para la patogénesis del glioblastoma primario: mutaciones y alteraciones en el número de copias (CNV, del inglés *copy number variation*) en los genes P53, PTEN, EGFR,

CDKN2A, CDKN2B, NF1, RB1, entre otros [34]. Además, hasta el 83 % de los glioblastomas primarios presentan mutaciones del promotor del gen TERT en las posiciones 124 pb (C228T) o 146 pb (C250T) corriente arriba del sitio ATG generando sitios de unión de factores de transcripción *de novo* que conducen a una mayor expresión génica con la posterior activación de los telómeros [34].

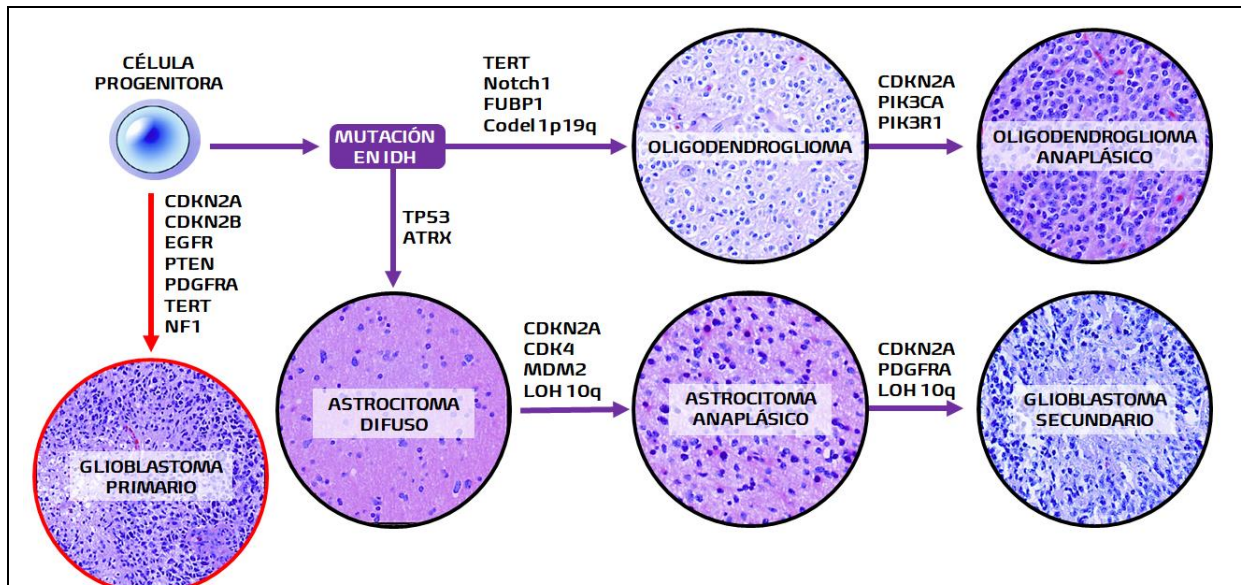


Figura 3. Descripción general de genes alterados en la formación de los tipos tumorales específicos durante la gliomagénesis. LOH: pérdida de heterocigosidad. Adaptado de Appin CL & Brat DJ, 2015 [32].

1.4. Actualización en la clasificación de los gliomas

En 2016, la OMS actualizó la clasificación para tumores de SNC dejando atrás el diagnóstico basado exclusivamente en la microscopía al incorporar marcadores moleculares para una mejor caracterización de estas neoplasias [35]. Esta nueva clasificación introdujo un enfoque revolucionario al combinar la histología tradicional basada en la célula de origen de la lesión y las características morfológicas asociadas al pronóstico, con los avances en biología molecular. Esto permitió una clasificación más precisa de los gliomas, reconociendo entidades tumorales definidas por alteraciones genéticas específicas (TABLA 3).

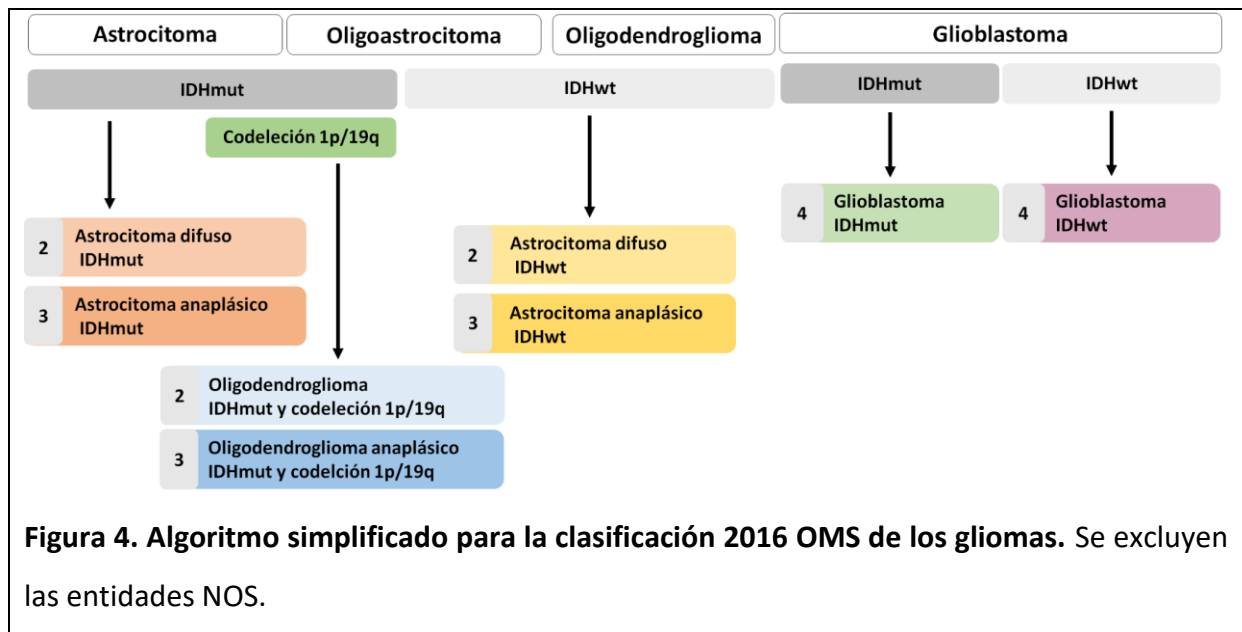
TABLA 3. Clasificación 2016 OMS de los gliomas y su grado histológico para las entidades más frecuentes.

ENTIDAD	GRADO
Astrocitoma difuso	
Astrocitoma difuso, IDHmut	2
Astrocitoma difuso, IDHwt	2
Astrocitoma difuso, NOS	2
Astrocitoma anaplásico	
Astrocitoma anaplásico, IDHmut	3
Astrocitoma anaplásico, IDHwt	3
Astrocitoma anaplásico, NOS	3
Glioblastoma	
Glioblastoma, IDHmut	4
Glioblastoma, IDHwt	4
Glioblastoma, NOS	4
Oligodendroglioma	
Oligodendroglioma, IDHmut y CD-1p/19q	2
Oligodendroglioma, NOS	2
Oligodendroglioma anaplásico	
Oligodendroglioma anaplásico, IDHmut y CD-1p/19q	3
Oligodendroglioma anaplásico, NOS	3

Los principales cambios fueron:

- *Incorporación de la mutación en IDH y CD-1p/19 (o mutaciones en ATRX) como biomarcadores moleculares para definir entidades tumorales con mayor precisión.*
- *Reclasificación de entidades tumorales en grupos basados en su perfil molecular, lo que llevó a la creación de nuevas categorías diagnósticas.*
- *Eliminación de términos obsoletos como glioblastoma primario o secundario y se adoptó una nomenclatura más precisa basada en marcadores moleculares.*
- *Designación de la sigla NOS (del inglés, *not otherwise specified*) en la nueva clasificación cuando no se dispone de los estudios moleculares para asignar al tumor en una categoría más específica, de forma que no se define una entidad, sino que se designa un grupo de lesiones que no pueden clasificarse en ninguno de los grupos más estrechamente definidos [35].*

La clasificación OMS 2016 otorgaría mayor precisión diagnóstica, ya que los biomarcadores moleculares no solo proporcionarían información valiosa sobre el comportamiento biológico del tumor, sino que permitiría identificar subgrupos de pacientes que podrían beneficiarse de nuevas terapias. La FIGURA 4 representa un algoritmo simplificado para la clasificación de los gliomas difusos basado en características histológicas y genéticas.



El uso de parámetros genotípicos y fenotípicos de forma integrada para la clasificación tumoral del SNC agrega un nivel de objetividad en algunos aspectos del proceso de diagnóstico. Sin embargo, la comprensión de las características moleculares de los gliomas ha demostrado que es poco probable que haya eventos genéticos o celulares únicos que puedan incluir a todos los pacientes. Si bien la clasificación 2016 de la OMS es un avance sustancial respecto de su antecesora, probablemente la incorporación en el futuro de nuevos biomarcadores moleculares producirá entidades biológicamente cada vez más homogéneas lo que conducirá a una mayor precisión diagnóstica, a un mejor manejo del paciente y una determinación más precisa del pronóstico y la respuesta al tratamiento.

1.5. Acciones terapéuticas en el manejo de los gliomas

El tratamiento de los gliomas depende de varios factores, incluyendo la estirpe o linaje tumoral, el grado histológico, la localización, el estado funcional del paciente y las características moleculares del tumor.

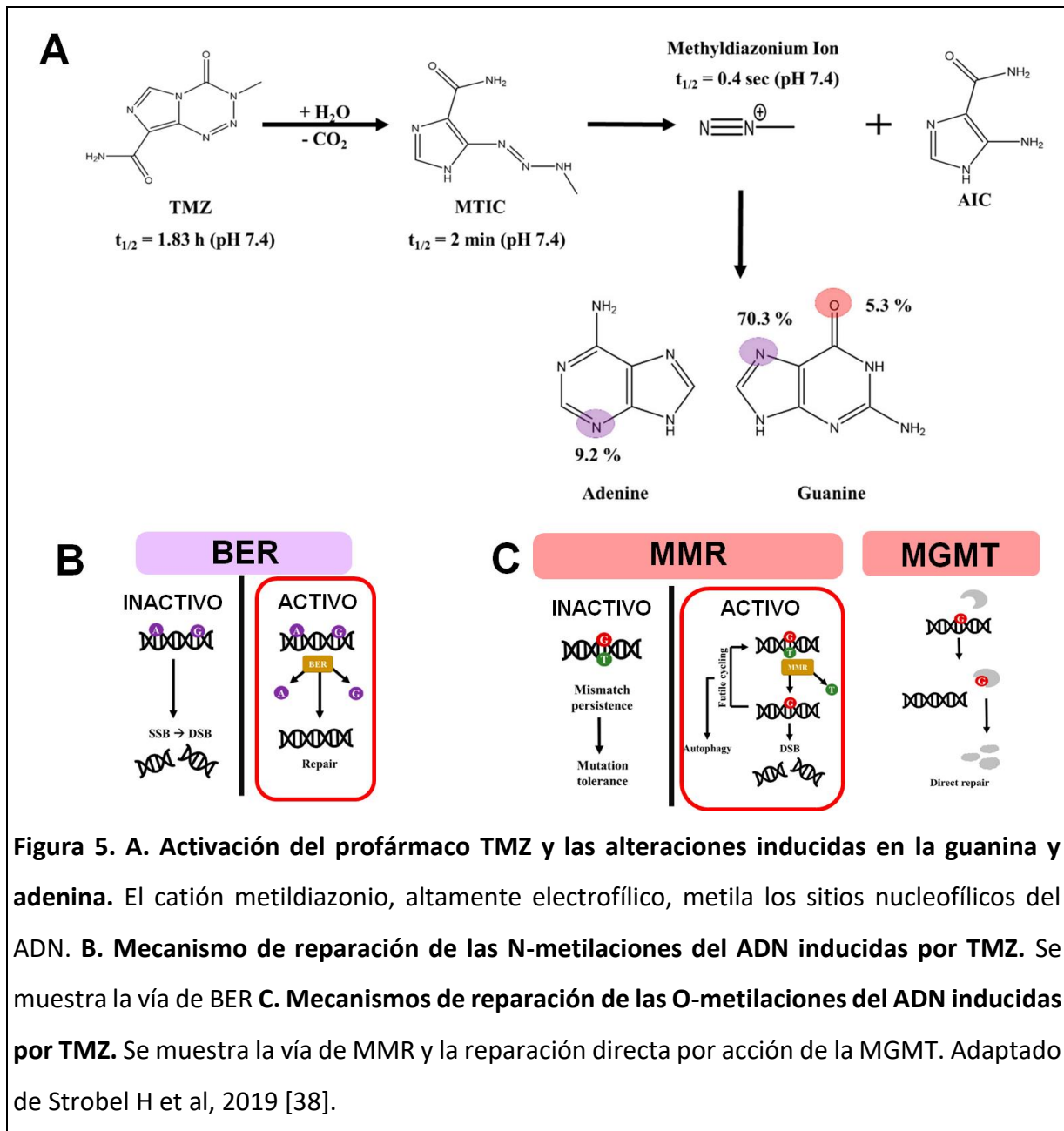
El enfoque general de tratamiento incluye:

- *Resección quirúrgica* mediante la cual se obtiene tejido tumoral para diagnóstico que mejora el control local, alivia los síntomas y permite mayor respuesta a tratamientos adyuvantes (radioterapia y quimioterapia).
- *Radioterapia* en gliomas de alto grado (grado 3 y 4) y algunos gliomas de bajo grado (grado 2) con factores de riesgo.
- *Quimioterapia* que se utiliza en combinación con la radioterapia o como tratamiento adyuvante. Para oligodendrogliomas se emplean regímenes de PCV (Procarbazona, Lomustina, Vincristina), mientras que para astrocitomas y glioblastomas se emplea **Temozolomida** (TMZ).

Para el manejo de los síntomas y la calidad de vida se administran corticosteroides para reducir el edema cerebral y anticonvulsivantes, complementándose con fisioterapia, terapia ocupacional y logopedia.

TMZ [3-metil-4-oxoimidazo[5,1-d][1,2,3,5]tetrazina-8-carboxamida] es un agente alquilante que pertenece al grupo de compuestos triazénicos. Es de naturaleza lipofílica por lo que atraviesa la barrera hematoencefálica (BHE) llegando al sitio del tumor en concentraciones terapéuticamente relevantes y puede administrarse por vía oral. Junto con la reducción tumoral máxima segura y la radioterapia focal, TMZ es parte esencial del tratamiento estándar actual del glioblastoma, prolongando la supervivencia general media de estos pacientes (de 12,1 meses a 14,6 meses) [36]. A pesar de esta mejora en la terapia, el pronóstico de los pacientes sigue siendo desalentador, con una supervivencia general a 5 años por debajo del 10% [37].

Los agentes alquilantes contienen grupos alquilo electrofílicos (C_nH_{2n+1}) que son transferidos a los átomos más nucleofílicos de las bases nitrogenadas del ADN. A diferencia de otros compuestos de triazeno, la TMZ no requiere activación metabólica y se convierte espontáneamente a pH sanguíneo en el compuesto intermediario 5-(3-metil-1-triazeno)imidazol-4-carboxamida (MTIC), el cual se descompone en 5-aminoimidazol-4-carboxamida (AIC) y en el catión electrofílico **metildiazonio** que es capaz de metilar el ADN principalmente en los residuos de guanina [38] (FIGURA 5A). La metilación del ADN puede ocurrir en la posición N7 (60-80%) o O6 (5%) de la guanina y en la posición N3 (10-20%) de la adenina [39]. Las células pueden reparar el daño inducido en el ADN por la TMZ a través de 3 mecanismos (FIGURAS 5B y 5C):



- **vía de reparación por escisión de bases** (BER, del inglés *Base Excision Repair*) que repara eficazmente las N-metilaciones del ADN más frecuentes como las N7-metilguanina y N3-metiladenina. Dado que rara vez BER se inactiva en los glioblastomas, el daño es reparado, y se contribuye a la resistencia terapéutica a la TMZ [40].
- **vía de reparación de desemparejamientos del ADN** (MMR, del inglés *DNA mismatch repair*) que repara las lesiones de apareamiento incorrecto de la O6-metilguanina con la timina, la cual se escinde y se reemplaza por otra timina tras la síntesis de reparación. Esto conduce a ciclos inútiles que consumen energía. La O6-metilguanina no reparada por

MMR, persiste en la cadena opuesta, lo que conduce a una detención de la horquilla de replicación, posteriores roturas de la doble cadena del ADN y finalmente a la apoptosis celular [41].

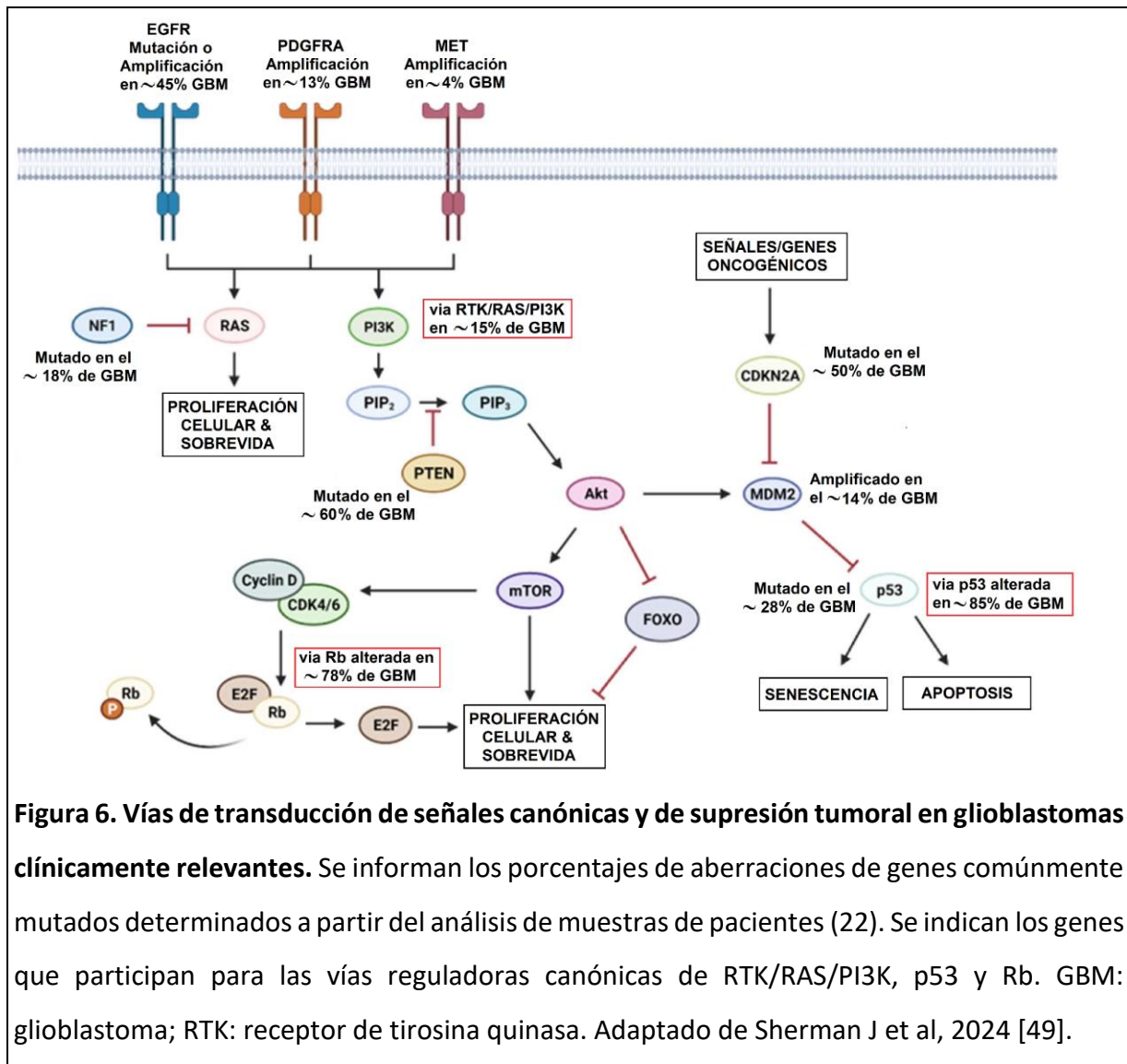
- **reparación directa de los aductos de O6-metilguanina por acción de la enzima suicida metilguanina-ADN metiltransferasa (MGMT)** cuando no pueden ser reparadas por el sistema MMR. Por lo tanto, una alta expresión del gen MGMT contrarresta la citotoxicidad inducida por TMZ y se vincula a farmacoresistencia (44). El nivel de expresión de MGMT es controlado por el estado de metilación en el promotor del gen MGMT (pMGMT). En el 30-60% de los pacientes con glioblastoma, el pMGMT está metilado lo que conlleva a la producción de niveles reducidos o nulos de la proteína. Este silenciamiento del gen MGMT ocurriría durante la gliomagénesis creando una célula tumoral genéticamente más inestable, pero mejor adaptada, que favorece el daño y las mutaciones en el ADN [38]. Aquellos pacientes con glioblastomas que recibieron tratamiento con TMZ y presentan pMGMT metilado (silenciado) presentaron una supervivencia general media mayor que aquellos con el pMGMT no metilado (activo): 21,7 meses vs 12,7 meses [13] [42].

1.6. Alteraciones somáticas en el glioblastoma

La patogénesis del glioblastoma es compleja debido a un genoma tumoral altamente desregulado donde están involucradas una red de vías de señalización interconectadas [43] [44]. Las tecnologías de alto rendimiento permitieron caracterizar muestras clínicas y proporcionar datos sobre el estado genómico de los gliomas (alteraciones genéticas, estado de metilación del ADN y regulación de la expresión génica). Los principales proyectos a gran escala como el Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA, del inglés *The Cancer Genome Atlas*), el Consorcio Internacional del Genoma del Cáncer (ICGC, del inglés *International Cancer Genome Consortium*) y el Atlas chino del genoma del glioma (CGGA, del inglés *Chinese Glioma Genome Atlas*) han generado una cantidad incomparable de datos genómicos funcionales [45] [46].

Estos proyectos cambiaron nuestra comprensión de estas neoplasias y sentaron las bases para la investigación en el diagnóstico, los tratamientos y la prevención. Los datos de secuenciación del exoma tumoral completo y de su transcriptoma han develado las alteraciones somáticas que afectan a las principales vías involucradas en la gliomagénesis (FIGURA 6). El análisis de 251 glioblastomas identificó conjuntos de genes en los que las

alteraciones somáticas eran significativamente mutuamente excluyentes y confirmó la exclusividad mutua entre las alteraciones que afectan la vía p53, la vía Rb y varios componentes que influyen en la vía PI3K [47].



1.7. Alteraciones en la vía RTK/RAS/PI3K

La vía de señalización RTK/RAS/PI3K es una ruta molecular crucial en la regulación de procesos celulares como el crecimiento, la proliferación, la supervivencia y el metabolismo. Esta vía involucra la interacción de 3 componentes principales:

1. Receptores Tirosina Quinasa (RTK, del inglés Receptor Tyrosine Kinase): son una familia de proteínas de membrana que actúan como receptores celulares para una variedad de señales extracelulares, como factores de crecimiento, hormonas y citoquinas. Los RTK

tienen una estructura característica que incluye un *dominio extracelular* altamente variable que contiene sitios de unión para ligandos específicos (EGF, FGF, PDGF, IGF, VEGF, etc), un *dominio transmembrana* hidrofóbico que ancla el receptor en la membrana plasmática, y un *dominio intracelular* tirosina quinasa (TK) responsable de la actividad enzimática del receptor desencadenando cascadas de señalización intracelular [48].

Los RTK activan múltiples vías de señalización que regulan procesos celulares clave:

- *proliferación celular*: activación de la vía RAS/MAPK, que promueve la transcripción de genes involucrados en el crecimiento y la división celular.
- *supervivencia celular*: activación de la vía PI3K/AKT, que inhibe la apoptosis.
- *metabolismo celular*: a través de la vía PI3K/AKT/mTOR regula la captación de glucosa y la síntesis de proteínas.
- *diferenciación y migración celular*: a través de la regulación de la morfología celular, la adhesión y la migración, procesos esenciales durante el desarrollo y la reparación tisular [48].

Mutaciones, amplificaciones o sobreexpresión de RTK (como EGFR y PDGFR) pueden conducir a una señalización hiperactiva, promoviendo la proliferación descontrolada y la supervivencia de células tumorales. Por ello los RTK son blancos terapéuticos importantes en el desarrollo de fármacos contra el cáncer, como los inhibidores de tirosina quinasa (por ejemplo, imatinib, gefitinib) y anticuerpos monoclonales (por ejemplo, trastuzumab) [50]. Esta vía se encuentra alterada en el 67,3% de los glioblastomas a través de presencia de mutaciones en los genes EGFR (57,5%), PTEN (41,0%), PI3K (25,1%), PDGFRA (10,0%), MET (1,6 %) y FGFR2/3 (3,2 %). Casi la mitad de los tumores con mutación en el gen PDGFRA (42,4%) y la mayoría con mutación en el gen MET (75,0%) poseían alteraciones concurrentes en el gen EGFR, lo que refleja un patrón de heterogeneidad intratumoral, el cual ya se ha documentado previamente [51]. Por otro lado, en el 59,4% de los glioblastomas, las mutaciones en el gen PI3K son mutuamente excluyentes de las mutaciones/deleciones del gen PTEN. Se observó mutaciones/deleciones del gen NF1 en el 10% de los casos, y nunca se presentó junto con mutaciones en el gen BRAF (2%) [21].

2. Proteína RAS: es una pequeña GTPasa que actúa como un interruptor molecular, alternando entre un estado activo (unido a GTP) y un estado inactivo (unido a GDP). La activación de RTK recluta proteínas adaptadoras (como GRB2 y SOS) que facilitan la

conversión. RAS activado (RAS-GTP) puede entonces interactuar con múltiples efectores, incluyendo la quinasa RAF, que inicia la cascada de la vía MAPK [52].

3. Fosfoinositida 3-Quinasa (PI3K): es una enzima que fosforila los lípidos de la membrana, específicamente el fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato (PIP2) para convertirlo en fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP3) el cual recluta proteínas que contienen dominios PH como la quinasa AKT. La activación de PI3K puede ser directa (por la unión de subunidades reguladoras) o indirecta (por la activación de RAS).

4. Quinasa AKT/PKB: es una serina/treonina quinasa que es activada por PIP3 y fosforila múltiples sustratos como TSC2 (que regula mTOR), BAD (una proteína pro-apoptótica), y GSK3 (glucógeno sintasa quinasa 3) [53].

La vía RTK/RAS/PI3K está regulada por varios mecanismos de retroalimentación negativa. Uno de ellos es a través de la fosfatasa PTEN que desfosforila PIP3 a PIP2, contrarrestando la actividad de PI3K. PTEN es un supresor tumoral y su pérdida de función conduce a una activación hiperactiva de la vía PI3K/AKT, promoviendo la proliferación, supervivencia y resistencia a la apoptosis de las células tumorales [54].

Las principales alteraciones presentes en glioblastomas de los genes involucrados en la vía RTK/RAS/PI3K se describen en la TABLA 4.

TABLA 4. Tipo de alteraciones en glioblastoma de los genes relacionados a la vía RTK/RAS/PI3K.

GEN	ALTERACIONES GENÉTICAS
EGFR [50] [55]	● <u>amplificación génica</u>: es la alteración más común, observada el 40% de los casos. ● <u>mutaciones activadoras</u>: la más frecuente es la delección del exón 2-7 (EGFRvIII) que resulta en un receptor truncado y constitutivamente activo, encontrándose presente en el 20-30% de los glioblastomas con amplificación de EGFR. ● <u>fusión génica</u>: se han reportado en algunos casos fusiones EGFR-SEPT14.
PDGFRA [56], [57]	● <u>amplificación génica</u>: presente en alrededor del 10% de los casos. ● <u>mutaciones activadoras</u>: variaciones de un único nucleótido en el dominio TK activan constitutivamente el receptor (V561M o D842V). ● <u>fusiones génicas</u>: se han reportado en algunos casos fusiones como PDGFRA-KDR o PDGFRA-CDK4.
FGFR [56] [58]	● <u>mutaciones activadoras</u>: en el dominio TK, como K656E o N546K. ● <u>fusiones génicas</u>: se han reportado fusiones como FGFR3-TACC3.
PTEN [59] [60]	● <u>mutaciones inactivadoras</u>: variantes puntuales o pequeñas delecciones que resultan en la pérdida de función de PTEN. ● <u>grandes delecciones génicas</u>: es frecuente la pérdida de una copia del gen (delección heterocigótica) o de ambas copias (delección homocigótica).

1.8. Alteraciones en la vía p53

La vía de señalización de p53 es una de las rutas moleculares más importantes en la regulación de la respuesta celular al estrés y en la prevención del cáncer. La proteína p53 actúa como un supresor tumoral al controlar procesos clave como la reparación del ADN, la detención del ciclo celular, la apoptosis (muerte celular programada) y la senescencia celular. p53 es una proteína nuclear, codificada por el gen TP53, que actúa como un factor de transcripción y, en condiciones normales, presenta niveles bajos debido a regulación negativa por las proteínas MDM2 (que ubiquitina p53 para su degradación por el proteasoma) y MDM4 (que no promueve su degradación directamente). A la vez, MDM2 es típicamente inhibido por CDKN2A en respuesta a señales o genes oncogénicos activados. Entre las funciones de p53, induce la expresión de la proteína p21 que es un inhibidor de las ciclinas dependientes de quinasa (CDK), lo que detiene el ciclo celular en la fase G1. Esto permite a la célula reparar el daño en el ADN antes de continuar con la división celular [61].

Esta vía se observa desregulada en el 85,3% de los tumores, a través de mutaciones o deleciones de TP53 (27,9%), la amplificación de MDM2/4 (15,1%) y/o la eliminación de CDKN2A (57,8%) [62]. En el glioblastoma, las alteraciones en la vía de p53, incluyendo a su regulador negativo MDM2 y a CDKN2A, son eventos moleculares frecuentes que contribuyen a la patogénesis y progresión del tumor. Las mutaciones en el gen TP53 son más frecuentes en el glioblastoma IDHmut que en el glioblastoma IDHwt, mientras que la amplificación o sobreexpresión del gen MDM2 lo es más en el glioblastoma IDHwt que en el glioblastoma IDHmut. Como se esperaba, las alteraciones de TP53 fueron mutuamente excluyentes con la amplificación de los genes de la familia MDM y CDKN2A [63].

Las principales alteraciones presentes en glioblastomas de los genes involucrados en la vía p53 se describen en la TABLA 5.

TABLA 5. Tipo de alteraciones en glioblastoma de los genes relacionados a la vía p53.

GEN	ALTERACIONES GENÉTICAS
TP53 [64]	• <u>mutaciones puntuales</u>: son las más comunes y ocurren principalmente entre los exones 5 al 8 que corresponden al dominio de unión al ADN de p53, lo que impide su función como factor de transcripción. • <u>deleciones o inserciones</u>: pueden resultar en la pérdida de función de p53. • <u>LOH</u>: es decir, la pérdida de una copia del gen TP53, es frecuente en glioblastoma.

MDM2 [65]	● <u>amplificación génica</u>: el aumento en el número de copias del gen MDM2, lo que resulta en una sobreexpresión de la proteína ● <u>sobreexpresión de la proteína</u>: se ha documentado un aumento en los niveles de la proteína MDM2 sin amplificación génica, posiblemente debido a mecanismos epigenéticos o de regulación postraduccional.
CDKN2A [66], [67]	● <u>deleciones génicas</u>: es la alteración más frecuente en el glioblastoma IDHwt (50-60%), y en general, implica la pérdida de ambas copias del gen. ● <u>otras alteraciones menos frecuentes</u>: se ha documentado mutaciones puntuales, silenciamiento epigenético por promotor metilado, LOH y rearrreglos genómicos.

1.9. Alteraciones en la vía Rb

La proteína pRB (codificada por el gen RB1) controla la transición de la fase G1 a la de síntesis en el ciclo celular. Cuando pRB no está fosforilada secuestra a E2F, factor de transcripción que activa los genes implicados en esta transición de G1 a S. La fosforilación de pRB se produce por la proteína CDK4 la cual es inhibida por la p16INK4a (codificada por el gen CDKN2A). La función anormal de pRB puede ser por la expresión alterada de los genes de RB1, CDK4 o CDKN2A, lo que provocará una fosforilación continuada de pRB que no podrá secuestrar a E2F, por lo que la división celular estará continuamente activada [66].

Las alteraciones en RB1 son más comunes en glioblastomas recurrentes (10-20%) y en algunos subtipos de gliomas de alto grado e incluyen deleciones del gen (una o ambas copias) y mutaciones puntuales. La amplificación del gen CDK4 ocurre en aproximadamente el 10-15% de los glioblastomas IDHwt, lo que resulta en una sobreexpresión de la proteína y una fosforilación excesiva e inactivación de RB1 [43]. Por compartir la vía p53, el gen CDKN2A exhibe las alteraciones ya descritas (TABLA 5).

1.10. Biomarcadores moleculares pronósticos y predictivos en gliomas

La clasificación y el manejo de los gliomas han evolucionado significativamente en las últimas décadas, con un enfoque creciente en los biomarcadores moleculares. Estos biomarcadores no solo permiten una clasificación más precisa de estas neoplasias, sino que también proporcionan información pronóstica y predictiva crucial para guiar el tratamiento.

Mientras que los **biomarcadores pronósticos** proporcionan información sobre la evolución natural de la enfermedad y ayudan a estimar la supervivencia de los pacientes, los **biomarcadores predictivos** ayudan a predecir la respuesta a tratamientos específicos. Por

ello, conocer estos biomarcadores en una enfermedad, especialmente en patologías complejas como el cáncer, es fundamental para mejorar el manejo clínico, personalizar el tratamiento y optimizar los resultados para los pacientes. La integración de estos biomarcadores en la práctica clínica permite una medicina más precisa y personalizada, mejorando los resultados para los pacientes.

Como mencionamos anteriormente, en 2016 la OMS incorporó los siguientes criterios moleculares junto con las características histológicas tradicionales, para lograr un enfoque integrado en el manejo de los gliomas [12]:

- **estado de IDHmut:** las mutaciones en el codón 132 del gen IDH1 o en el codón 172 del gen IDH2 conducen a la producción del oncometabolito 2-hidroxiglutarato (2-HG) que altera la epigenética celular. Los pacientes con gliomas IDHmut tienen un mejor pronóstico, con una supervivencia media de 5-10 años en astrocitomas difusos y oligodendrogliomas difusos/anaplásicos. Por otro lado, los gliomas IDHwt, especialmente el glioblastoma, tienen un pronóstico más desfavorable con una supervivencia media de 12-15 meses [68].
- **CD-1p/19q:** la pérdida conjunta de los brazos cromosómicos 1p y 19q es un marcador presente en oligodendrogliomas y se asocian a una mayor supervivencia (10-15 años) y una mejor respuesta al tratamiento con quimioterapia y radioterapia [69].
- **Mutaciones en el gen ATRX:** estas mutaciones son comunes en astrocitomas IDHmut y se asocian con un mejor pronóstico en astrocitomas difusos, con una supervivencia media de 5-10 años y una menor tasa de recurrencia [70].
- **Estado de metilación del pMGMT:** cuando el promotor se encuentra metilado se produce el silenciamiento en la expresión del gen. El estado metilado, no sólo se asocia a una mejora en la supervivencia global en pacientes con glioblastoma (18-23 meses vs 12-15 meses), sino a una mayor probabilidad de responder a la TMZ [71].

El objetivo de la incorporación de estos biomarcadores moleculares es no solo definir subtipos moleculares con comportamientos biológicos y pronósticos diferentes, sino reducir la subjetividad de la histología tradicional.

Nuestro grupo de trabajo multidisciplinario de médicos y bioquímicos ha incorporado el diagnóstico tradicional histopatológico de los gliomas en la práctica clínica. Por medio del subsidio *Innovación productiva 2015* de la Agencia Santaferina de Ciencia, Tecnología e Innovación (ASaCTel) se han desarrollado y optimizado los ensayos para implementar los biomarcadores moleculares recomendados por la OMS. La integración de estos

biomarcadores en la práctica clínica representa un avance significativo hacia la medicina de precisión, donde el tratamiento se adapta a las características individuales de cada paciente y su enfermedad. Sin embargo, es necesario continuar investigando para identificar nuevos biomarcadores, validar su utilidad clínica y superar los desafíos actuales, como la heterogeneidad tumoral y el acceso de los pacientes a las pruebas moleculares avanzadas. En general, los tratamientos actuales no específicos tienden a ser reemplazados con la utilización de fármacos desarrollados en respuesta a la comprensión de la biología molecular de los tumores. Por ello, las terapias futuras requerirán conocer el genotipo tumoral de cada paciente.

Nuestra **hipótesis de trabajo** consiste en que una mejor caracterización de los gliomas por medio de la introducción de nuevos biomarcadores permitirá definir subtipos homogéneos molecularmente proporcionando información que pueda ser relevante de los aspectos clínicos y biológicos de estas neoplasias. De esta forma, el enfoque integrado propuesto para el manejo de los gliomas y la incorporación futura de nuevos biomarcadores en la práctica clínica permitirá superar los desafíos actuales, identificar potenciales objetivos terapéuticos y aprovechar todo este potencial en la búsqueda de terapias personalizadas, específicas y menos tóxicas. Por ello, el **objetivo general de este trabajo de tesis** es la clasificación anatomopatológica de los gliomas en subgrupos molecularmente homogéneos mediante la incorporación de nuevos biomarcadores moleculares, los cuales aportarán información del pronóstico y la predicción de respuesta al tratamiento. Para lograrlo, se establecen los siguientes **objetivos específicos**:

- Clasificar los gliomas en base al enfoque integrado de la OMS 2016 y evaluar si la introducción de biomarcadores moleculares permite definir entidades molecularmente homogéneas.
- Caracterización y valoración de las alteraciones moleculares en los genes PDGFRA, EGFR, CDKN2A/B, PTEN, MGMT, CDK4, MDM2, NFKBIA y TP53 en gliomas que ayuden a un mejor diagnóstico de los tumores.
- Evaluación de estas alteraciones moleculares como factores pronósticos y/o predictivos de severidad y respuesta al tratamiento actual mediante el análisis de datos clínicos e índice de supervivencia de los pacientes en dos años de seguimiento, mediante curvas de supervivencia de Kaplan-Meier.

2. DESARROLLO

2.1. *Diseño general del estudio*

Para llevar adelante este proyecto de tesis se optó por un estudio observacional retrospectivo que busca un enfoque integrado en pacientes con tumores gliales del SNC mediante la incorporación de nuevos biomarcadores moleculares a las técnicas histopatológicas de rutina en la práctica clínica.

Los sujetos de estudio fueron pacientes adultos (entre las edades de 20-85 años) que se hayan realizado una biopsia de tumor glial a criterio del Médico Especialista en Neurología, Neurocirugía u Oncología y hayan sido diagnosticados entre los años 2005 y 2017.

Se utilizaron muestras de biopsias del archivo (tacoteca) del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital de Emergencias “Dr. Clemente Álvarez” y del Centro de Diagnóstico Patológico S.R.L. que presta servicio al Grupo Gamma S.A. Se revisaron las historias clínicas de estos pacientes para obtener datos relevantes de estudios previos en relación con su patología.

Las muestras debieron cumplir con los siguientes criterios propuestos para este estudio:

- ***criterios de inclusión:***

- pacientes que se hayan sometido a una biopsia de tumor glial entre 2005 y 2017.
- presente, a criterio del Médico Especialista en Anatomía Patológica, un estudio histológico compatible con el diagnóstico de glioma.
- se dispone del tejido tumoral parafinado en cantidad y calidad suficientes para la realización de estudios moleculares.
- se encuentre a disposición la historia clínica con datos relevantes relacionados a la patología en estudio.

- ***criterios de exclusión:***

- paciente que, a criterio del Médico Especialista en Anatomía Patológica, su estudio histológico no sea compatible con el diagnóstico de glioma.
- pacientes pediátricos.
- no se dispone de material suficiente para realizar todos los estudios moleculares.
- presente una historia clínica incompleta no pudiéndose obtener los datos necesarios para la estimación de sobrevida.

- individuos con más de un cáncer primario (es decir, un glioma y cáncer de otro sitio) con el objetivo de hacer el máximo esfuerzo por examinar una población de estudio homogénea y reducir la probabilidad de incluir individuos con lesiones metastásicas.
- pacientes que hayan sido diagnosticados *post-mortem*.

2.2. Consideraciones éticas

El estudio cumplió con todos los requerimientos éticos correspondientes, ya que siguió los estándares éticos internacionales de la guía de buenas prácticas clínicas. El proyecto fue evaluado por dos comités de ética independientes: el de la institución privada en donde se llevó a cabo la investigación (Grupo Gamma), y el correspondiente a la Facultad de Ciencias Médicas en donde se ha realizado este doctorado.

Los procedimientos a emplear en la obtención y uso de las muestras clínicas que se utilizaron en este trabajo se realizaron teniendo en cuenta los criterios necesarios para cumplimentar con la Ley Nacional N° 25.326 de “Protección de los Datos Personales”. En base a estas consideraciones se puede afirmar que:

- el estudio utilizó muestras residuales,
- las muestras no fueron identificables individualmente,
- las muestras no fueron utilizadas para finalidades incompatibles con aquellas que motivaron su obtención, y
- las personas a cargo de pacientes cuyas muestras serán estudiadas no participaron de la investigación ni compartieron información con quienes condujeran la misma.
- los pacientes firmaron el consentimiento informado en el contexto de la práctica médica.

Todos los estudios y procedimientos realizados en este trabajo se ajustaron a la Declaración de Helsinki.

2.3. Procedimientos y ensayos

2.3.1. Preparación de la muestra

La totalidad de los estudios fueron realizados a partir de tejido fijado e incluido en parafina (tacos de biopsia) disponibles en los archivos (tacotecas) de los centros anatomopatológicos participantes. La fijación del tejido mediante inmersión en formol al 10% permite preservar la estructura celular y evitar la degradación del tejido. Luego, se lleva a cabo un proceso de deshidratación sumergiendo el tejido en una serie de soluciones alcohólicas de concentración

creciente para eliminar el agua del tejido. Se continúa, con el proceso de aclaración, usando un solvente orgánico (xileno o tolueno), para eliminar el alcohol y permitir que, finalmente, cuando entre en contacto con la parafina líquida caliente (60°C), ésta pueda infiltrarse adecuadamente en el tejido.

Una vez obtenido el taco de parafina se procedió a cortar secciones de 3 a 5 micrómetros de grosor (láminas) utilizando un micrótopo (Leica RM2125 RTS, *Leica Biosystems*, EE. UU.).

Para los estudios histológicos e inmunohistoquímicos, estas láminas fueron montadas (fijadas) en portaobjetos mediante calentamiento ligero para su tinción.

Para los estudios moleculares, se tiene en consideración la proporción de tejido tumoral presente en lámina y la calidad del tejido. Si el tejido tumoral comprende 80% o más de la superficie total y no se observa necrosis, se colocaron de 3 a 5 láminas en tubos plásticos de 1,5ml para su posterior procesamiento. Este valor de corte (proporción mínima de células tumorales respecto de células normales) se eligió en función de las proporciones alélicas observadas en muestras con diferentes proporciones tumor/normalidad y reportadas por otros investigadores [72]. Si el porcentaje de tejido tumoral es menor o se evidencia regiones necróticas, se montan de 3 a 5 láminas en portaobjetos con el objetivo de marcar las regiones óptimas, raspar el tejido tumoral con bisturí y colocarlo en tubos plásticos de 1,5ml para su posterior procesamiento.

2.3.2. Estudios histológicos

Se empleó la tinción hematoxilina y eosina (H&E) que consta de los siguientes pasos:

1. desparafinación de las láminas montadas en el portaobjeto por inmersión en xileno.
2. rehidratación del tejido con una serie de lavados en alcohol de concentración decreciente.
3. tinción con hematoxilina (colorante básico que tiñe estructuras ácidas de color azul o púrpura, de forma que se une principalmente a los núcleos celulares y a otras estructuras ricas en ácidos nucleicos) y lavado con una solución ácida suave para eliminar restos del colorante.
4. tinción con eosina (colorante ácido que tiñe estructuras básicas de color rosa o rojo, ya que se une a proteínas citoplasmáticas, colágeno y otras estructuras extracelulares) y lavado con agua para eliminar excesos de colorante.
5. deshidratación con soluciones de alcohol de concentración creciente.
6. aclaración del tejido con xileno.
7. colocación de un medio de montaje como bálsamo de Canadá o resina sintética.

Mediante observación microscópica (Leica DM500, *Leica Biosystems*, EE. UU.) se determinó la arquitectura tisular, la morfología celular (tamaño, forma, relación núcleo-citoplasma), la presencia de anomalías (atipia celular, mitosis anormales, etc) y la distribución y características de las estructuras extracelulares (colágeno, fibras elásticas, etc).

Todas las muestras con H&E fueron revisadas por dos anatomopatólogos independientes quienes hicieron diagnósticos de consenso.

2.3.3. Estudios inmunohistoquímicos

La inmunohistoquímica (IHQ) es una técnica fundamental en el diagnóstico y estudio de los gliomas, ya que permite identificar marcadores específicos asociados con estos tumores cerebrales. Utiliza anticuerpos específicos para detectar proteínas o antígenos en tejidos que se visualizan mediante reacciones cromogénicas, permitiendo identificar la localización y expresión de marcadores específicos en las células.

Se realizó una IHQ automatizada en láminas de 5 µm de espesor con un complejo de avidina-biotina-peroxidasa en Benchmark XT (*Ventana Medical System Inc.*, EE. UU.), utilizando el kit Ventana que incluye reactivo cromogénico diaminobenzidina (DAB) para buscar la expresión de GFAP (1:50, clon EP672Y, *Cell Marque*, EE.UU.), Ki-67 (1:50 clon 30-9, *Ventana Medical System Inc.*, EE.UU.), sinaptofisina (1:50, clon MRQ-40, *Cell Marque*, EE.UU.) e IDH1-R132H (1:40, clon H09, *Dianova GmbH*, Alemania). Los ensayos se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se realizaron controles negativos omitiendo el anticuerpo primario. La evaluación de cada IHQ estuvo a cargo de dos anatomopatólogos que desconocían todos los detalles del paciente.

Brevemente, para su realización se siguen los siguientes pasos:

1. desparafinación de las láminas montadas en el portaobjeto por inmersión en xileno.
2. rehidratación del tejido con una serie de lavados en alcohol de concentración decreciente.
3. recuperación antigénica (exponer los posibles epítopes antigénicos enmascarados durante la fijación) mediante calor leve.
4. bloqueo de la actividad de peroxidasa endógena mediante aplicación de peróxido de hidrógeno y evitar reacciones no específicas.
5. aplicación del anticuerpo primario específico, incubación por 1 hora y posterior lavado.
6. aplicación del anticuerpo secundario conjugado con la enzima peroxidasa que se une al anticuerpo primario, incubación por 1 hora y posterior lavado.

7. revelado mediante la adición de DAB que reacciona con la peroxidasa para producir un color marrón visible.
8. contratinción con hematoxilina para teñir los núcleos y proporcionar contraste.
9. deshidratación con soluciones de alcohol de concentración creciente, aclaración del tejido con xileno y colocación de un medio de montaje como bálsamo de Canadá o resina sintética.

La **proteína Ki-67** se encuentra asociada con la proliferación celular, y se expresa en las células que están en fase activa del ciclo celular (fases G1, S, G2 y M). Mediante la IHQ, se cuantifica el porcentaje de células tumorales que muestran tinción nuclear positiva, y se determina la fracción de células tumorales Ki-67-positivas expresada en porcentaje. El índice Ki-67 se correlaciona con el curso clínico del tumor y aumenta con el grado de malignidad (< 5% en tumores de bajo grado, 5 - 10% en gliomas anaplásicos y > 10% en glioblastomas) [73] [74]. Para nuestro estudio, el nivel de expresión de Ki-67 se calificó como alto (>5 % de tinción nuclear) o bajo (< 5% de tinción nuclear). Un índice > 5% sugiere un tumor más agresivo, es decir, un mayor crecimiento tumoral y un peor pronóstico.

La **GFAP** (Proteína Glio-fibrilar Ácida, del inglés *Glial fibrillary acidic protein*) es específica de las células gliales y su positividad por IHQ (tinción citoplasmática en las células tumorales de origen astrocítico) ayuda a confirmar el origen glial del tumor y a diferenciar los gliomas de otros tumores cerebrales [75].

La **sinaptofisina** es una proteína que se encuentra en las vesículas sinápticas de las neuronas y es un marcador específico de tejido neuronal y neuroendocrino. En términos generales, la ausencia de tinción positiva en IHQ apoya el diagnóstico de glioma y ayuda a excluir otros tumores que podrían tener un componente neuronal o neuroendocrino. En algunas excepciones, algunos subtipos de gliomas pueden mostrar positividad focal [76] [77].

La **variante R132H en el gen IDH1** detectada por IHQ se realiza utilizando el anticuerpo monoclonal H09 (*Dianova GmbH*, Alemania) cuya tinción positiva se observa como una señal nuclear y citoplasmática en las células tumorales [78] [79]. Es importante destacar que no permite detectar otras mutaciones menos frecuentes en el gen IDH1 o mutaciones en el gen IDH2.

2.3.4. Estudios moleculares

2.3.4.1. Obtención del ADN tumoral. A partir de las láminas del tejido parafinado, se realizó la extracción del ADN tumoral por medio de métodos comerciales de columnas de intercambio iónico (*Roche Diagnostics*, Suiza). Brevemente, el ADN se liberó del fragmento de tejido mediante incubación en una solución de proteinasa K, preparada a partir de los componentes del kit, durante 8 horas a 56°C seguidas de 60 minutos a 90°C para inactivar la enzima. Posteriormente, el ADN es capturado en columnas de sílica, lavado y eluido según las instrucciones del fabricante. El ADN purificado fue cuantificado por medidas de absorbancia a 260 nm (absorbancia máxima debido a las bases nitrogenadas) y fue evaluada su pureza respecto a contaminantes (proteínas con la relación de absorbancia a 260 y 280, y sales, fenol o carbohidratos con la relación de absorbancia a 260 y 230) (NanoPhotometer P360, Implén, Alemania). Finalmente, cada extracto de ADN se almacenó a -20°C en alícuotas hasta su uso. Diluciones adecuadas del ADN tumoral se utilizaron para la realización de los ensayos moleculares mencionados a continuación.

2.3.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa de punto final (PCR) seguida de Secuenciación por método Sanger. Brevemente, los cebadores empleados en este trabajo se diseñaron y evaluaron mediante herramientas informáticas (Primer3Plus [80], PrimerBLAST [81] y BioEdit [82]) a partir de las bases de datos genómicas NCBI, Ensembl, y GeneAtlas. Las reacciones fueron llevadas a cabo en el equipo Veriti™ Thermal Cycler, 96-well Fast (*Applied Biosystems*, EE. UU.) y reveladas mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 5%. Los productos de amplificación obtenidos fueron purificados con método comercial de columna de sílica (NucleoSpin Gel and PCR Clean-up, *Macherey-Nagel*, Alemania) y cuantificados por medidas de absorbancia a 260 nm (NanoPhotometer P360, Implén, Alemania). Luego, se realizó la reacción enzimática de Sanger con dideoxinucleótidos terminadores marcados fluorescentemente (BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit, *Thermo Fisher Scientific*, EE. UU.) y su posterior separación mediante electroforesis capilar (SeqStudio Genetic Analyzer, *Thermo Fisher Scientific*, EE.UU.). El análisis de los cromatogramas se llevó a cabo con programas informáticos específicos (SeqA y BioEdit,). Estas técnicas se utilizaron para la detección de las variantes en el codón 132 del gen IDH1 y en el codón 172 del gen IDH2 presentes en el exón 4 de cada gen.

2.3.4.3. Amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples (MLPA, del inglés *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*). Mediante esta técnica, desarrollada por

MRC Holland (Países Bajos), se pueden detectar alteraciones en el número de copias de secuencias en el ADN (deleciones, duplicaciones o amplificaciones) así como variantes de un único nucleótido en regiones específicas del genoma [83] [84]. MLPA es una técnica de PCR multiplex que utiliza un único par de cebadores para amplificar hasta 60 sondas MLPA, cada una con un objetivo genómico y una longitud únicos. Los amplicones de PCR resultantes se encuentran marcados con fluorocromos y se separan y cuantifican mediante electroforesis capilar. Al comparar el patrón de picos resultante de una muestra con los de un conjunto de muestras de referencia, se puede determinar la cantidad de objetivos genómicos presentes en la muestra de interés.

Las sondas MLPA se dirigen a una secuencia genómica específica. Se distinguen 2 tipos de sondas:

- LPO (del inglés, *left probe oligonucleotide*): conformada por secuencias de hibridación al ADN y a un cebador sentido universal.
- RPO (del inglés, *right probe oligonucleotide*): conformada por secuencias de hibridación de ADN y a un cebador antisentido universal, y una secuencia de relleno adicional que le da a cada sonda una longitud única.

En el primer paso, se desnaturaliza el ADN de purificado seguido de una incubación durante 16 horas con las sondas MLPA. Así, LPO y RPO de cada sonda se hibridan inmediatamente adyacentes en secuencias específicas del ADN (FIGURA 7a).

En un segundo paso, se procede a la ligación de LPO y RPO que se hibridaron de forma adyacentes, en una reacción altamente específica. La cantidad de productos de ligación es una medida de la cantidad de secuencias objetivo en la muestra (FIGURA 7b).

En un tercer paso, las sondas ligadas se amplifican en una PCR multiplex utilizando un único par de cebadores universales (FIGURA 7c). Solo las sondas ligadas se amplifican exponencialmente, las cuales se separan mediante electroforesis capilar (SeqStudio Genetic Analyzer, Thermo Fisher Scientific, EE.UU.), donde cada fragmento corresponde a una sonda MLPA específica (FIGURA 7d).

El análisis de datos se realizó con el software Coffalyser.Net™ (*MRC Holland*, Países Bajos). Los números de copias relativos se determinan comparando las alturas relativas de cada pico de las sondas de referencia y las sondas MLPA en las muestras de ADN tumoral con las de las muestras de referencia con un número de copias normal conocido. Los controles de calidad presentes en cada ensayo ayudan a reconocer datos poco fiables.

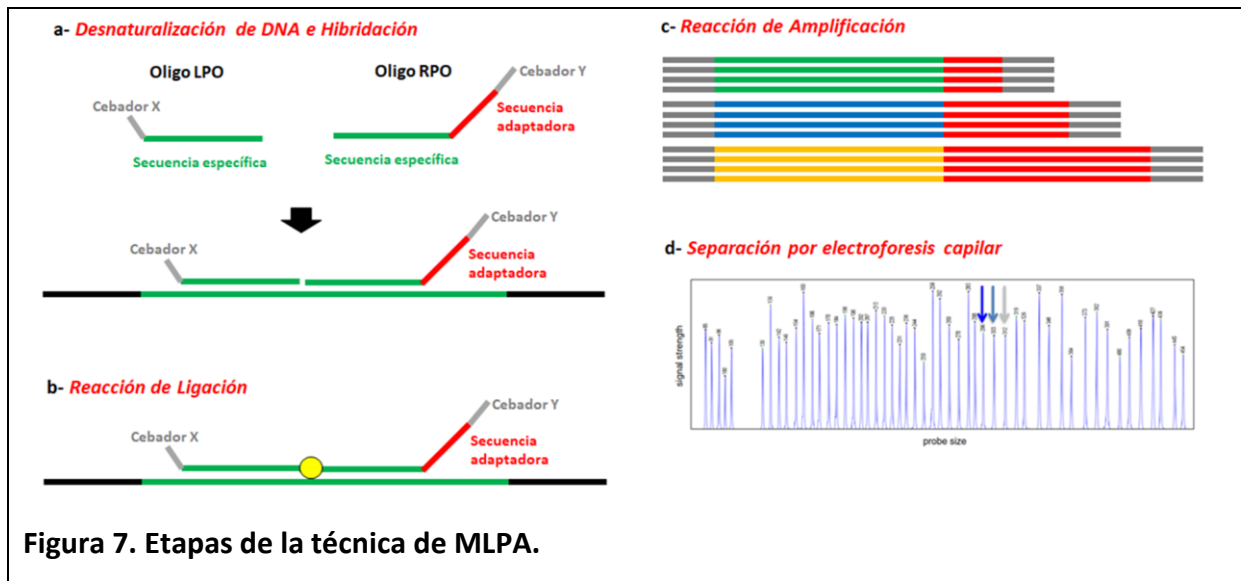


Figura 7. Etapas de la técnica de MLPA.

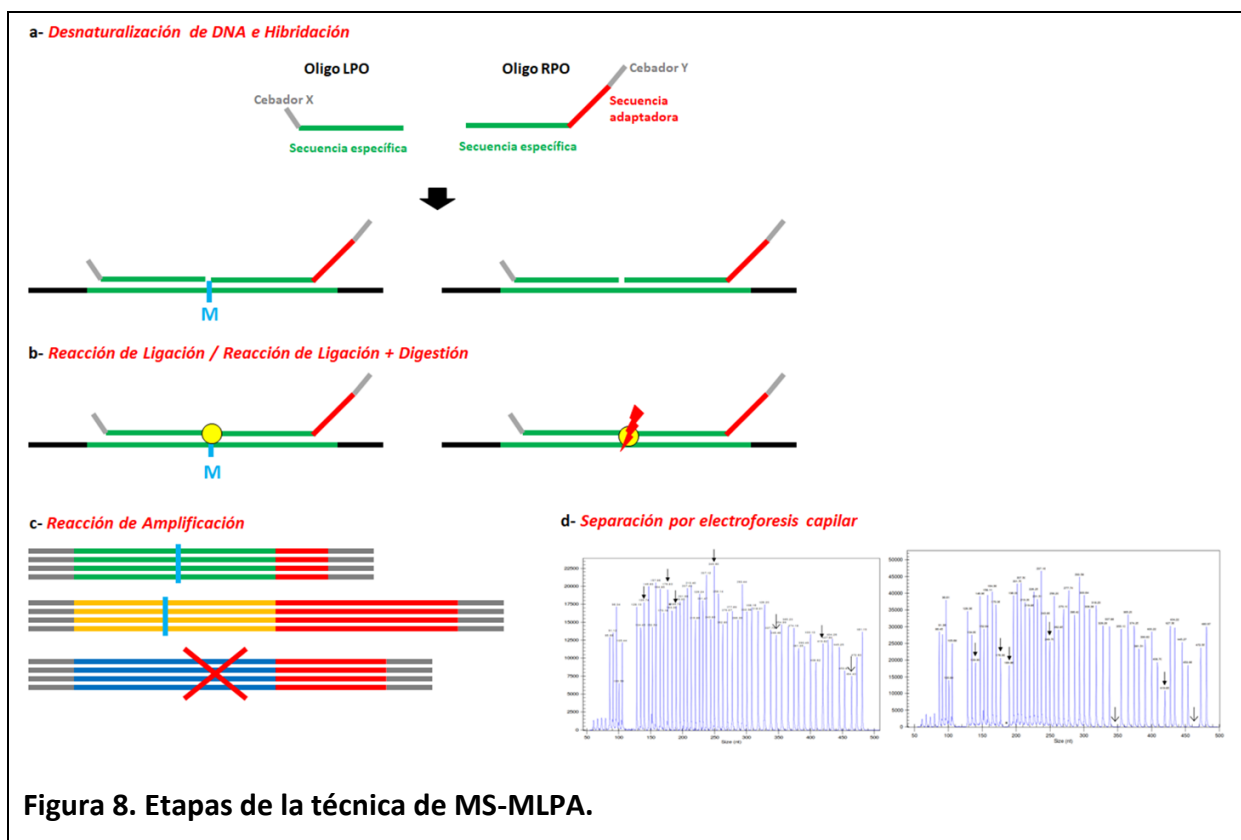
Para este trabajo de tesis se emplearon las siguientes mezclas de sondas MLPA:

- **SALSA® MLPA® probemix P088-C2 Oligodendroglioma 1p-19q:** permite detectar la pérdida de los brazos cromosómicos 1p y 19q, cambios en el número de copias de los genes CDKN2A y CDKN2B, y variantes puntuales más comunes de los genes IDH1 (R132H y R132C) e IDH2 (R172K y R172M).
- **SALSA® MLPA® probemix P105-D2 Glioma-2:** permite detectar las alteraciones o aberraciones del número de copias de los principales genes de las 3 vías de señalización críticas de la gliomagénesis (vías RTK/PI3K, p53 y Rb): PDGFRA (4q12), EGFR (7p11.2), CDKN2A (9p21.3), PTEN (10q23.31), TP53 (17p13.1), CDK4-MIR26A2-MDM2 (12q14 - q15) y NFKBIA (14q13.2). Esta mezcla de sondas también permite la detección de deleciones de EGFR que dan lugar a la variante EGFRvIII.

2.3.4.4. Amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples - metilación específica (MS-MLPA, del inglés *Methylation-specific - MLPA*). Esta técnica es una variante de la técnica MLPA (*MRC Holland*, Países Bajos) que permite detectar no solo alteraciones en el número de copias de secuencias de ADN, sino también cambios en los patrones de metilación del ADN de forma semicuantitativa en múltiples sitios genómicos de forma simultánea [85]. Además de las sondas MLPA ya descritas (LPO+RPO), se suman sondas MS-MLPA que son similares a las otras, pero se diseña LPO para incluir sitios de reconocimiento de enzimas de restricción sensibles a la metilación, como HhaI (FIGURA 8a). Estas enzimas cortan el ADN solo si no está metilado, lo que permite diferenciar entre ADN metilado y no metilado.

Luego de la hibridación por 16 horas, el ADN con las sondas hibridación se separan en dos tubos: a uno de los tubos se le agrega la enzima HhaI para digerir complejos de ADN-sonda no metilados mientras que al otro no (FIGURA 8b). Ambas continúan con el procesamiento ya descrito para MLPA.

De esta forma, en ausencia de metilación del ADN, la sonda MS-MLPA que se hibrida es digerida por HhaI por lo que no se pueden amplificar exponencialmente y, por lo tanto, no producen señal (FIGURA 8c). Al contrario, en presencia de metilación del ADN, la sonda MS-MLPA que se hibridó no es digerida por HhaI y generará una señal normal (FIGURA 8d).



Para este trabajo de tesis se emplearon la siguiente mezcla de sondas MS-MLPA:

- **SALSA® MLPA® probemix ME012-A1 MGMT-IDH1-IDH2:** permite detectar cambios en el número de copias del promotor del gen MGMT y las variantes puntuales más comunes de los genes IDH1 (R132H y R132C) e IDH2 (R172K y R172M). Además, contiene 6 sondas MS-MLPA que detectan el estado de metilación del promotor del gen MGMT.

La metodología MLPA permite determinar el número de copias mediante la comparación de diferentes muestras no digeridas, y patrones de metilación mediante la comparación de cada muestra no digerida con su homóloga digerida (solo para mezclas de sondas MS-MLPA) y sirve para semicuantificar el porcentaje de metilación en una muestra determinada.

- **Análisis del número de copias:** se utilizan los datos intranormalizados (alturas de pico relativas). Para ello, los datos generados en la muestra sin digerir deben normalizarse primero intramuestra dividiendo la señal de cada sonda entre la señal de cada sonda de referencia de esa muestra, creando así tantas proporciones por sonda como sondas de referencia haya. Posteriormente, se debe obtener la mediana de todas estas proporciones producidas por sonda, denominada la Constante de Normalización de la sonda y se utiliza para la comparación entre muestras de referencia.
- La proporción final de sondas o *estado de ploidía* de cada sonda en cada muestra (*ratio*) se calcula dividiendo la Constante de Normalización de cada sonda obtenida en la muestra del paciente y la Constante de Normalización promedio de esa sonda obtenida en las muestras de referencia sin digerir. De esta manera, un *ratio* $\sim 1,0$ indica un número normal de alelos (2 copias), un *ratio* $\sim 0,5$ indica delección de 1 alelo (1 copia) y un *ratio* $\sim 0,0$ indica delección de ambos alelos (0 copia).
- **Análisis de metilación:** el estado de metilación de cada sonda MS-MLPA en cada muestra se calcula dividiendo la Constante de Normalización de cada sonda obtenida en la muestra digerida y la Constante de Normalización de cada sonda MS-MLPA obtenida en la muestra sin digerir correspondiente (*ratio*). Si este *ratio* se multiplica por 100 se obtiene una estimación del porcentaje de metilación. El porcentaje de metilación del promotor se puede estimar promediando el porcentaje de metilación de las sondas MS-MLPA. De esta manera, un *ratio* $\sim 1,0$ indica un 100% de metilación del o los alelos, un *ratio* $\sim 0,5$ indica un 50% de metilación del o los alelos y un *ratio* $\sim 0,0$ indica un 0% de metilación del o los alelos.

2.4. Análisis estadístico

Las estimaciones de las probabilidades de supervivencia (con intervalos de confianza del 95%) se calcularon utilizando la metodología del límite del producto Kaplan-Meier y se compararon mediante una prueba de rangos logarítmicos de Wilcoxon [86]. El tiempo medio de supervivencia se estima como el área bajo la curva de supervivencia en el intervalo de 0 a $t_{\text{máx}}$ [87]. Para determinar si las curvas de supervivencia de dos o más grupos son estadísticamente diferentes se utilizó la prueba no paramétrica de Log-Rank. Esto significa que, si la prueba encuentra una diferencia significativa, se puede inferir que la supervivencia de un grupo es diferente a la de otro [88].

3. RESULTADOS

3.1. Características de los pacientes

La totalidad de las muestras de biopsias utilizadas fueron de los archivos de los Servicios anatomopatológicos. Se seleccionaron 200 pacientes, 100 pacientes de cada Servicio médico, que cumplieran con los criterios de inclusión del estudio. Luego de aplicar los criterios de exclusión, se descartaron 61 pacientes porque no había cantidad suficiente de tejido tumoral parafinado para la revisión diagnóstica, y 20 casos más de los restantes por no contar la historia clínica con los datos necesarios. Finalmente, **un total de 119 pacientes cumplieron con los criterios estipulados**: 78 casos (65%) eran de sexo masculino con una edad media de 52 años (rango de 22 a 80 años) y 41 casos (35%) del sexo femenino con una edad media de 55 años (rango de 23 a 83 años). La mayoría de los pacientes (91/119, 76%) tenían 55 años o más.

Los tumores gliales de los 119 pacientes fueron originalmente caracterizados utilizando la clasificación de tumores del Sistema Nervioso Central 2007 de la OMS. La composición de la cohorte en estudio en base a esta clasificación se detalla en la TABLA 6.

TABLA 6. Clasificación 2007 OMS de los 119 gliomas estudiados		
ENTIDAD	GRADO	Nº CASOS
Astrocitoma difuso	2	5
Astrocitoma anaplásico	3	9
	3/4	3
Glioblastoma	4	73
Oligodendroglioma difuso	2	6
Oligodendroglioma anaplásico	3	9
Oligoastrocitoma	2	1
Gliomas no clasificados	2	6
	3	1
	3/4	4
	S/D	2
TOTAL		119

S/D: sin datos

3.2. Biomarcadores y reclasificación de los gliomas según OMS 2016

Con el objetivo de lograr un informe integrado de cada glioma, en los 119 casos se realizó la tinción histológica de H&E (determinación de estirpe) (Figura 9A) y los estudios IHQ para Ki-67 (determinación de grado), GFAP y sinaptofisina (Figura 9B).

La determinación del estado de mutación de IDH1-132 e IDH2-172 se realizó por 3 metodologías:

- IHQ que permite la detección de la variante R132H en la proteína IDH1 (Figura 9B).
- MLPA (Probemix P088) que detecta 4 de las variantes más frecuentes (R132H y R132C en el gen IDH1, y R172K y R172M en el gen IDH2).
- Amplificación del exón 4 de cada gen seguida de secuenciación Sanger que posibilita determinar la totalidad de las variantes posibles.

Finalmente, la CD-1p/19q se investigó utilizando la técnica de MLPA (Probemix P088).

Los resultados de los distintos biomarcadores para la cohorte en estudio se detallan en la TABLA 7 con la reclasificación de cada uno de ellos en base al enfoque integrado utilizando la clasificación de tumores del SNC 2016 de la OMS (OMS-2016).

Los estudios mostraron:

- todos los tumores presentaron marcación para GFAP.
- el 12,5% (1/8) de los oligodendrogliomas anaplásicos, IDHmut y CD-1p/19q, 30% (3/10) de los astrocitomas anaplásicos, IDHwt y 10,25% (9/78) de los glioblastomas IDHwt mostraron focal positividad para Sinaptofisina.
- 26 tumores presentaron mutación en el gen IDH1 en (p.R132H: 25; p.R132C: 1), mientras que 3 tumores lo hicieron en el gen IDH2 en (p.R172K: 1, p.R172G: 1, p.R172C: 1).
- se observó la presencia de CD-1p/19q en 8 tumores.

La mutación R132H-IDH1 se detectó por todos los métodos realizados (IHQ, MLPA y secuenciación), las mutaciones p.R132C-IDH1 y p.R172K-IDH2 se detectaron por 2 de los métodos (MLPA y secuenciación), mientras las mutaciones menos frecuentes del gen IDH2 (R172G y R172S) se detectaron solo por secuenciación.

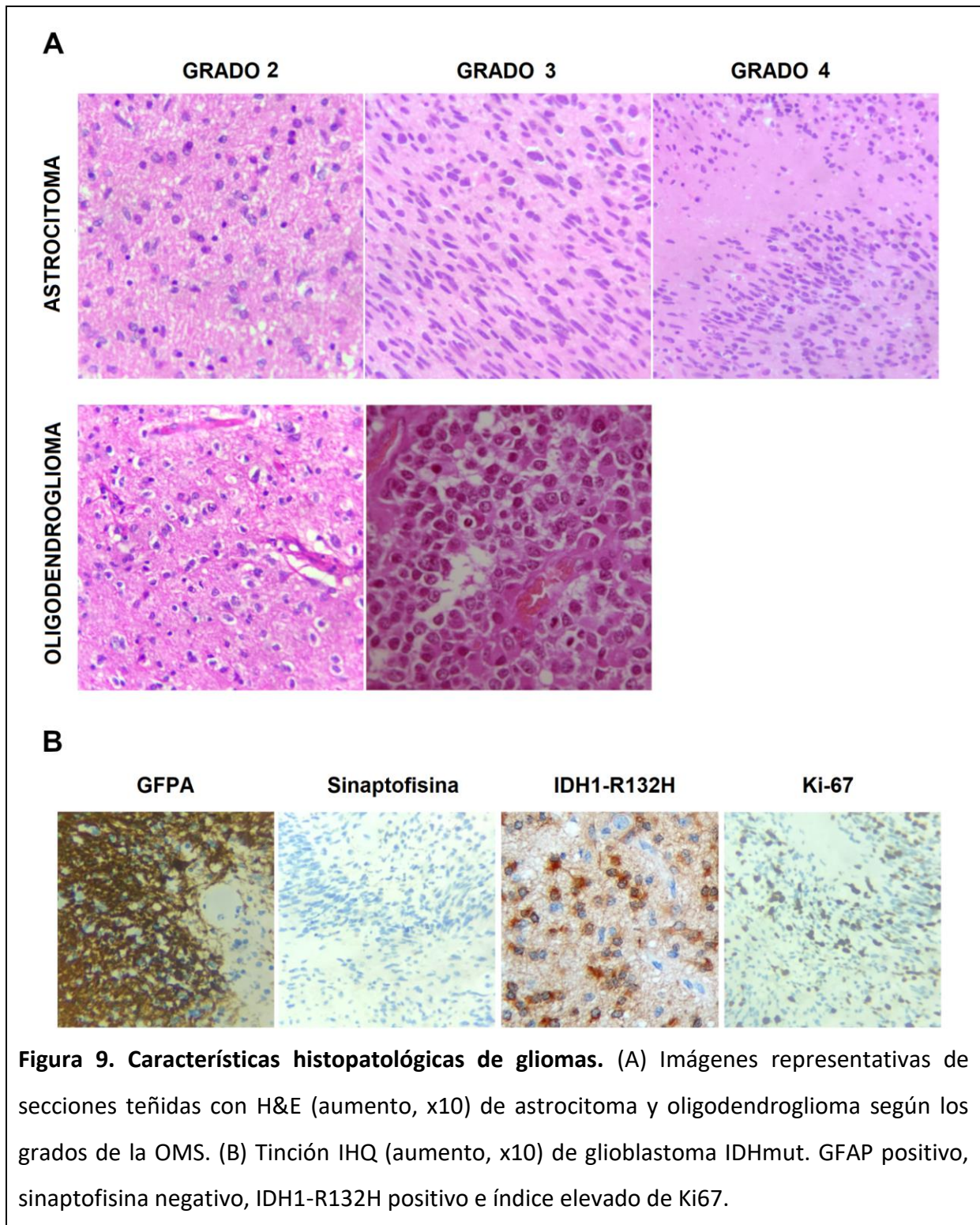


TABLA 7. Clasificación 2016 OMS de los 119 gliomas estudiados.

ID	GENERO	EDAD	GFAP	Ki67	Sinaptofisina	IDH1 R132H IHQ	IDH1/IDH2 MLPA	IDH1/IDH2 SEQ	CD-1p/19q (MLPA)	CLASIFICACIÓN OMS 2016
Glio 19	M	35	POS	8%	POS	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Astrocitoma anaplásico IDHwt
H09	M	41	POS	15%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Astrocitoma anaplásico IDHwt
G25	F	22	POS	10%	POS	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Astrocitoma anaplásico IDHwt
H30	M	57	POS	10%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	//	Astrocitoma anaplásico IDHwt
H45	M	46	POS	11%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Astrocitoma anaplásico IDHwt
M8597	M	33	POS	7%	POS	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Astrocitoma anaplásico IDHwt
H48	F	30	POS	5%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	//	Astrocitoma anaplásico IDHwt
Glio 04	M	39	POS	15%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Astrocitoma anaplásico IDHwt
H21	F	60	POS	10%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Astrocitoma anaplásico IDHwt
H31	M	51	POS	5%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	//	Astrocitoma anaplásico IDHwt
H20	M	46	POS	15%	NEG	NEG	NO DET	R172G	//	Astrocitoma anaplásico, IDHmut
H18	M	57	POS	7%	NEG	POS	R132H	R132H	NO DET	Astrocitoma anaplásico, IDHmut
M7463	F	27	//	//	//	POS	R132H	R132H	NO DET	Astrocitoma anaplásico, IDHmut
H06	M	23	POS	7%	NEG	POS	R132H	R132H	NO DET	Astrocitoma anaplásico, IDHmut
H41	M	35	POS	10%	NEG	POS	R132H	R132H	//	Astrocitoma anaplásico, IDHmut
H24	M	25	POS	10%	NEG	POS	R132H	R132H	NO DET	Astrocitoma anaplásico, IDHmut
Glio 15	M	57	POS	3%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Astrocitoma difuso, IDHmut
Glio 06	M		POS	5%	NEG	POS	R132H	R132H	NO DET	Astrocitoma difuso, IDHmut
H27	M	33	POS	3%	NEG	POS	R132H	R132H	NO DET	Astrocitoma difuso, IDHmut
Glio 13	M	42	POS	4%	//	POS	R132H	R132H	NO DET	Astrocitoma difuso, IDHmut
G19	M	53	POS	5%	NEG	POS	R132H	R132H	NO DET	Astrocitoma difuso, IDHmut
H11	M	47	POS	3%	NEG	POS	R132H	R132H	NO DET	Astrocitoma difuso, IDHmut

H39	M	27	POS	2%	NEG	NEG	R132H	R132H	//	Astrocitoma difuso, IDHmut
H34	M	59	POS	4%	NEG	POS	R132H	R132H	//	Astrocitoma difuso, IDHmut
G35	F	37	POS	2%	NEG	NEG	R172K	R172K	NO DET	Astrocitoma difuso, IDHmut
Glio 21	M	41	POS	4%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Astrocitoma difuso, IDHwt
M8961	M	55	POS	30%	//	NEG	NO DET	R172S	NO DET	Glioblastoma IDHmut
Glio 08	M	25	POS	30%	NEG	POS	R132H	R132H	NO DET	Glioblastoma IDHmut
M7464	F	47	POS	13%	NEG	NEG	R132C	R132C	NO DET	Glioblastoma IDHmut
H15	M	39	POS	40%	NEG	POS	R132H	R132H	NO DET	Glioblastoma IDHmut
Glio 16	M	59	POS	20%	NEG	POS	R132H	R132H	NO DET	Glioblastoma IDHmut
Glio 07	M	38	POS	70%	NEG	POS	R132H	R132H	NO DET	Glioblastoma IDHmut
M7698	M	67	POS	18%	NEG	POS	R132H	R132H	NO DET	Glioblastoma IDHmut
H35	M	69	POS	20%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	//	Glioblastoma IDHwt
Glio 20	F	57	POS	20%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
M7816	M	52	POS	12%	POS	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
G23	M	72	POS	30%	POS	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
G30	F	55	POS	16%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
H28	F	46	POS	50%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	//	Glioblastoma IDHwt
G33	F	48	POS	15%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
G32	M	49	POS	15%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
G45	M	72	POS	30%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
Glio 02	M	72	POS	20%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
Glio 10	M	61	//	//	//	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
G46	F	53	POS	15%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	//	Glioblastoma IDHwt
Glio 18	M	50	POS	30%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
H01	M	57	POS	15%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt

G22	M	71	POS	30%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
G43	F	68	POS	10%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
G44	F	80	POS	25%	POS	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
Glio 01	F	44	POS	13%	-	NEG	NO DET	NO DET	//	Glioblastoma IDHwt
H37	M	48	POS	20%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	//	Glioblastoma IDHwt
G49	F	63	POS	20%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
H23	F	58	POS	40%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
H47	M	55	POS	18%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	//	Glioblastoma IDHwt
M7465	F	40	POS	18%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
G09	M	60	POS	30%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
H10	F	56	POS	8%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
H26	F	40	POS	10%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
G37	M	60	POS	25%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
H12	M	54	POS	20%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
G36	M	51	POS	25%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
H50	F	64	POS	15%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	//	Glioblastoma IDHwt
H02	M	67	POS	20%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
G18	M	62	POS	35%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
M7558	M	56	POS	24%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	//	Glioblastoma IDHwt
G40	M	58	POS	15%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
H05	M	56	POS	30%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
Glio 12	F	58	POS	25%	POS	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
H08	M	62	POS	40%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
G12	F	49	POS	13%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
H19	F	22	POS	20%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt

G39	M	68	POS	10%	POS	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
H32	F	60	POS	15%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	//	Glioblastoma IDHwt
G10	M		POS	35%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
H13	F	57	POS	25%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
G42	M	54	POS	10%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
H03	F	58	POS	20%	POS	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
H40	F	61	POS	15%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	//	Glioblastoma IDHwt
H16	M	ns	POS	20%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
H17	M	55	POS	15%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
G31	F	74	POS	22%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
H42	F	47	POS	45%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	//	Glioblastoma IDHwt
M7545	M	52	POS	10%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
G11	M	73	POS	30%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
G48	M	69	POS	25%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
H49	M	52	POS	21%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	//	Glioblastoma IDHwt
G47	M	58	POS	12%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
Glio 03	M	67	POS	40%	POS	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
Glio 14	F	38	POS	30%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
G21	F	57	POS	30%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
G26	M	78	POS	22%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
H43	F	41	POS	40%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	//	Glioblastoma IDHwt
G29	F	52	POS	25%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
G01	F	62	POS	10%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
G16	M	57	POS	20%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
G24	F	74	POS	45%	POS	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt

Glio 11	M	83	//	//	//	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
G02	M	61	POS	25%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
H25	F	49	POS	20%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	//	Glioblastoma IDHwt
H38	F	55	POS	20%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	//	Glioblastoma IDHwt
G14	F	54	POS	40%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
H36	M	59	POS	15%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	//	Glioblastoma IDHwt
H46	M	62	POS	30%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
M8376	M	64	POS	25%	POS	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
H44	F	55	POS	40%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	//	Glioblastoma IDHwt
G03	M	//	POS	30%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
G15	M	80	POS	45%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
G17	M	60	POS	25%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
G05	M	53	POS	30%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
G08	F	77	POS	25%	NEG	NEG	NO DET	NO DET	NO DET	Glioblastoma IDHwt
G20	M	63	POS	12%	POS	POS	R132H	R132H	DET	Oligodendroglioma anaplásico, IDHmut y CD-1p/19q
H22	M	66	POS	7%	NEG	POS	R132H	R132H	DET	Oligodendroglioma anaplásico, IDHmut y CD-1p/19q
Glio 22	F	45	POS	20%	NEG	POS	R132H	R132H	DET	Oligodendroglioma anaplásico, IDHmut y CD-1p/19q
Glio 09	M	32	POS	9%	NEG	POS	R132H	R132H	DET	Oligodendroglioma, IDHmut y CD-1p/19q
H29	M	31	POS	2%	NEG	POS	R132H	R132H	DET	Oligodendroglioma, IDHmut y CD-1p/19q
G28	M	50	POS	2%	NEG	POS	R132H	R132H	DET	Oligodendroglioma, IDHmut y CD-1p/19q
G27	M	65	POS	2%	NEG	POS	R132H	R132H	DET	Oligodendroglioma, IDHmut y CD-1p/19q
Glio 05	M	//	POS	20%	NEG	POS	R132H	R132H	DET	Oligodendroglioma, IDHmut y CD-1p/19q

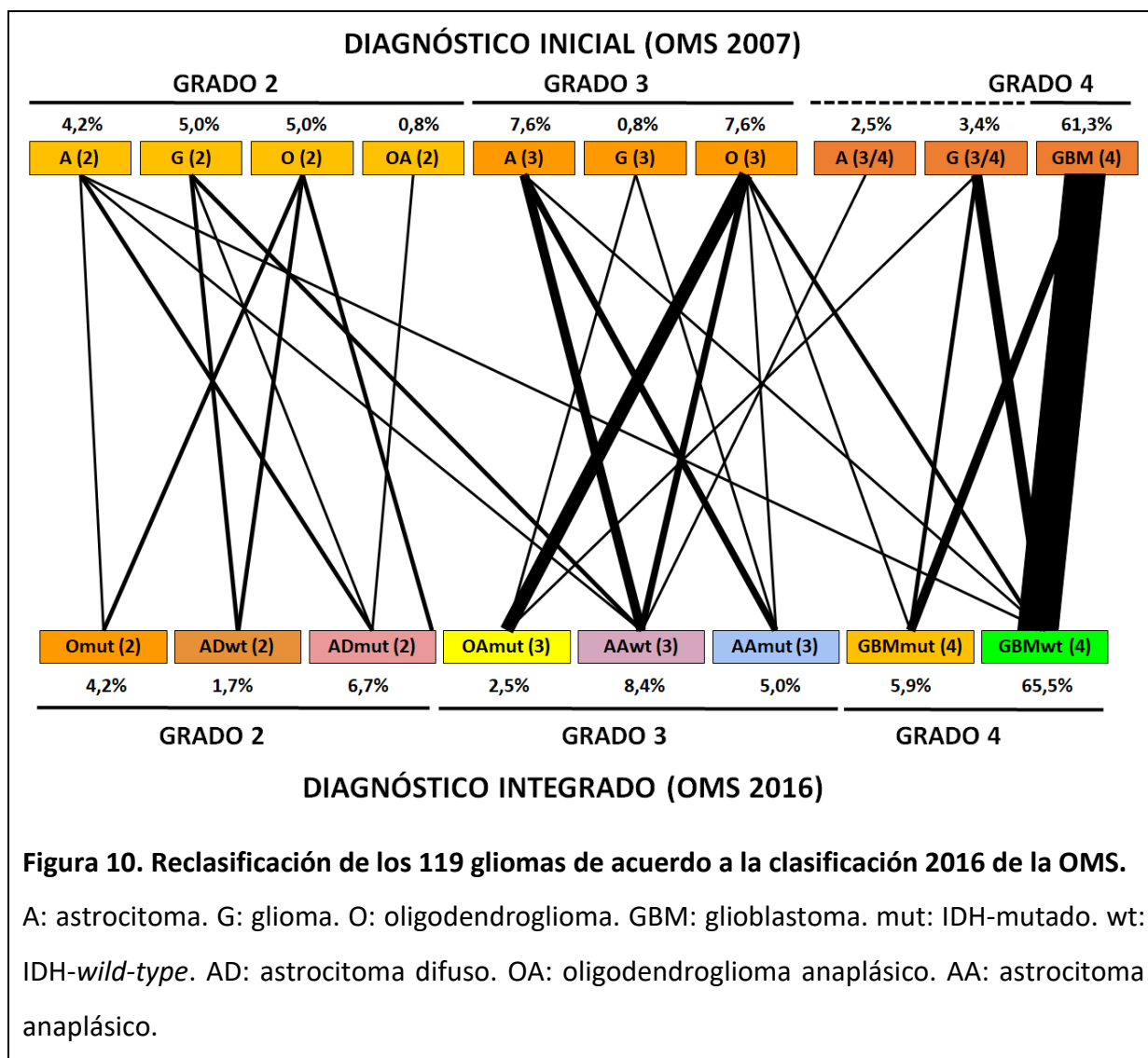
//: no realizado o no disponible.

La reclasificación molecular permitió dividir a los gliomas de la cohorte en 8 subgrupos según la presencia de mutaciones en el gen IDH y CD-1p/19q, los cuales se detallan en la TABLA 8.

TABLA 8. Clasificación 2016 OMS de los 119 gliomas, su grado histológico y número de casos.		
ENTIDAD	GRADO	N° CASOS (%)
Astrocitoma difuso		
Astrocitoma difuso, IDHmut	2	9 (7,6%)
Astrocitoma difuso, IDHwt	2	1 (0,8%)
Astrocitoma anaplásico		
Astrocitoma anaplásico, IDHmut	3	6 (5,0%)
Astrocitoma anaplásico, IDHwt	3	10 (8,4%)
Glioblastoma		
Glioblastoma, IDHmut	4	7 (5,9%)
Glioblastoma, IDHwt	4	78 (65,6%)
Oligodendroglioma		
Oligodendroglioma, IDHmut y CD-1p/19q	2	5 (4,2%)
Oligodendroglioma anaplásico		
Oligodendroglioma anaplásico, IDHmut y CD-1p/19q	3	3 (2,5%)
TOTAL		119 (100%)

Cuando se comparan los diagnósticos de los gliomas, se observa modificación en 32 casos (27%). En cuanto a la histología tumoral, el 60% de los oligodendrogliomas, el 35% de los astrocitomas y el 100% de los gliomas no clasificados fueron reclasificados, mientras que los glioblastomas mantuvieron su clasificación inicial. En el 18,5% de las muestras se modificó el grado histológico; y en casi todas ellas (95%) hubo un incremento de grado 2 a 3. La FIGURA 10 esquematiza la modificación en el diagnóstico para ambas clasificaciones.

En base a esto, se analizó y evaluó el impacto que ha tenido la nueva clasificación diagnóstica de los gliomas en el valor pronóstico del grado histológico y con respecto a su estado IDH. Para ello, en base a los datos de supervivencia a 2 años de los pacientes se realizaron gráficas de supervivencia de Kaplan-Meier. Los datos se muestran en la TABLA 9.

**TABLA 9. Datos de OS de la cohorte de 119 gliomas.**

ID	WHO 2007	WHO 2016	Grado según OS	Fecha Dx	Fecha óbito	OS (meses)
G01	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	21/06/2005	16/05/2006	11,0
G02	A II	GBM IDHwt	Subgrupo I	05/09/2005	13/09/2005	0,3
G03	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	26/01/2006	16/06/2007	16,9
G05	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	28/11/2006	28/11/2007	12,2
G08	A III	GBM IDHwt	Subgrupo I	12/02/2007	23/02/2007	0,4
G09	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	04/06/2007	27/12/2007	6,9
G10	O III	GBM IDHwt	Subgrupo I	12/09/2007	27/01/2009	16,8
G11	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	18/06/2013	06/02/2014	7,8
G12	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	21/02/2013	18/05/2013	2,9
G14	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	07/08/2012	28/11/2012	3,8
G15	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	07/06/2011	12/06/2011	0,2
G16	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	27/05/2010	01/06/2010	0,2

G17	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	06/04/2010	12/10/2012	30,7
G18	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	16/06/2009	18/04/2011	22,4
G19	OA	AD IDHmut	Subgrupo III	19/02/2015	27/06/2016	16,5
G20	O II	OA	Subgrupo III	03/03/2015	18/06/2016	15,8
G21	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	01/04/2015	19/08/2015	4,7
G22	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	11/09/2015	18/11/2015	2,3
G23	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	15/10/2014	07/12/2014	1,8
G24	O III	GBM IDHwt	Subgrupo I	04/04/2014	17/07/2014	3,5
G25	A II	AA IDHmut	Subgrupo III	18/12/2013	09/03/2016	27,1
G26	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	02/07/2013	11/09/2013	2,4
G27	O III	O	Subgrupo III	04/06/2013	03/05/2019	72,0
G28	A II	O	Subgrupo III	18/05/2013	28/09/2015	28,8
G29	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	04/03/2013	29/06/2014	16,1
G30	A III-IV	GBM IDHwt	Subgrupo I	16/01/2013	26/06/2013	5,4
G31	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	21/12/2012	21/02/2013	2,1
G32	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	24/07/2012	09/10/2012	2,6
G33	A III-IV	GBM IDHwt	Subgrupo I	31/05/2012	19/05/2013	11,8
G35	UG	AD IDHmut	Subgrupo III	22/02/2012	15/04/2019	87,0
G36	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	07/03/2012	15/04/2013	13,5
G37	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	08/02/2011	10/04/2014	38,6
G39	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	09/11/2010	30/06/2011	7,8
G40	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	05/02/2010	06/03/2010	1,0
G42	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	15/12/2008	13/05/2013	53,7
G43	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	18/11/2008	11/03/2009	3,8
G44	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	23/09/2008	25/10/2008	1,1
G45	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	19/02/2008	13/10/2009	20,1
G46	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	21/11/2007	01/03/2008	3,4
G47	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	13/11/2007	10/04/2008	5,0
G48	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	06/11/2007	31/03/2008	4,9
G49	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	09/10/2007	22/11/2007	1,5
Glio 01	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	07/07/2017	24/04/2019	21,9
Glio 02	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	18/07/2017	21/09/2017	2,2
Glio 03	O II	GBM IDHwt	Subgrupo I	31/07/2017	21/05/2019	22,0
Glio 04	G II	AA IDHmut	Subgrupo III	08/08/2017	12/03/2019	19,4
Glio 05	G III/IV	O	Subgrupo III	09/08/2017	27/04/2019	20,9
Glio 06	G II	AD IDHmut	Subgrupo III	28/07/2017	18/05/2019	22,0
Glio 07	GBM	GBM IDHmut	Subgrupo II	28/07/2017	21/05/2019	22,1
Glio 08	GBM	GBM IDHmut	Subgrupo II	28/07/2017	18/05/2019	22,0
Glio 09	O II	O	Subgrupo III	14/08/2017	05/05/2019	21,0

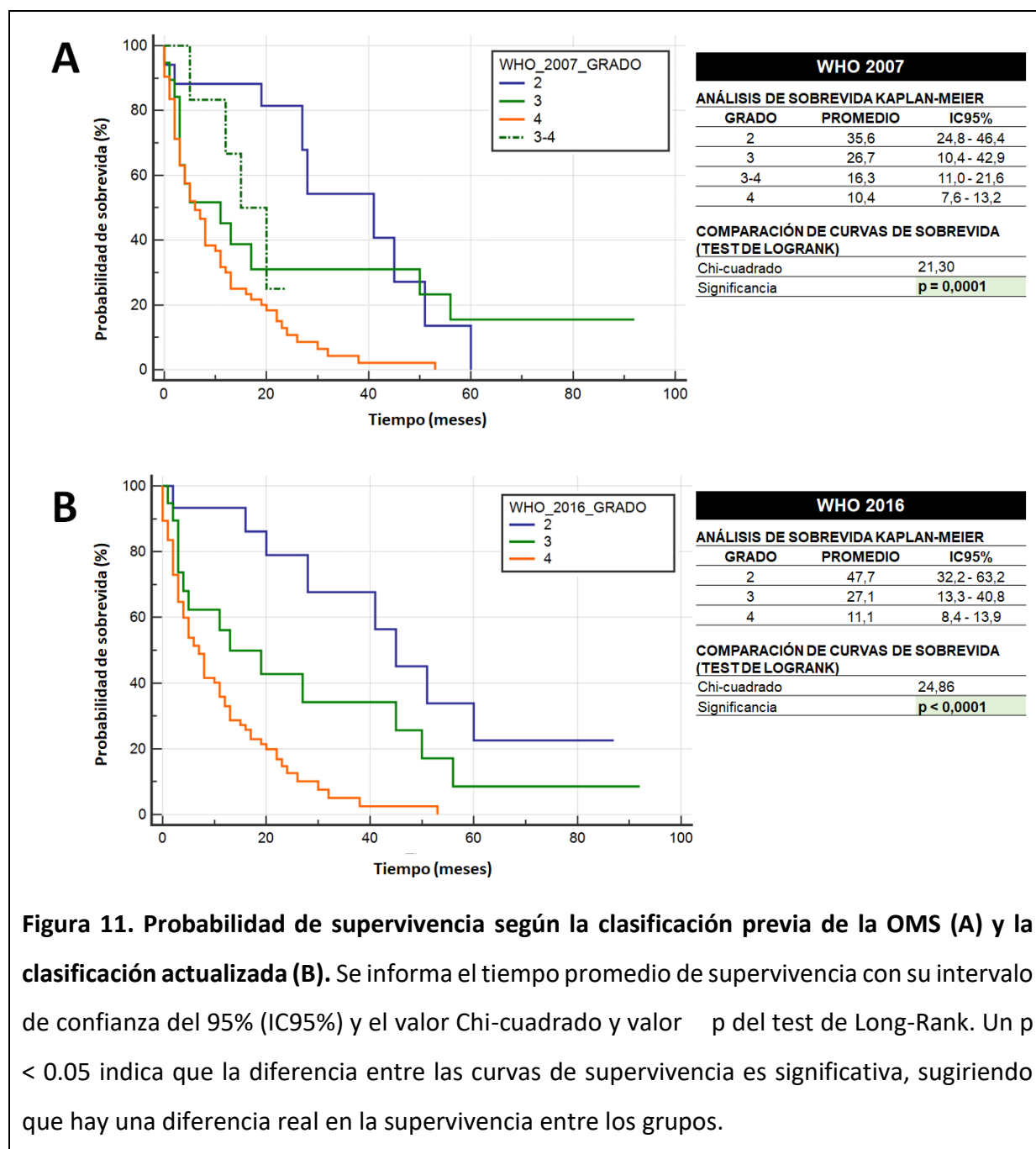
Glio 10	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	07/06/2016	06/01/2018	19,3
Glio 11	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	29/08/2017	28/04/2018	8,1
Glio 12	G III/IV	GBM IDHwt	Subgrupo I	05/09/2017	04/02/2018	5,1
Glio 13	G II	AD IDHmut	Subgrupo III	20/09/2017	12/05/2019	20,0
Glio 14	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	02/10/2017	26/10/2018	13,0
Glio 15	G II	AD IDHmut	Subgrupo III	07/10/2017	28/07/2019	22,0
Glio 16	G III/IV	GBM IDHmut	Subgrupo II	25/10/2017	01/02/2019	15,5
Glio 18	A III/IV	GBM IDHwt	Subgrupo I	15/11/2017	04/07/2019	19,9
Glio 19	G II	AA IDHmut	Subgrupo III	09/11/2017	28/06/2019	19,9
Glio 20	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	18/12/2017	09/02/2018	1,8
Glio 21	G II	AD IDHwt	Subgrupo III	09/01/2018	05/10/2018	9,0
Glio 22	O III	OA	Subgrupo III	22/01/2018	16/05/2019	16,0
H01	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	12/01/2005	02/04/2005	2,7
H02	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	28/01/2005	17/07/2005	5,7
H03	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	17/02/2005	03/03/2005	0,5
H05	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	11/03/2005	08/05/2007	26,3
H06	A III	AA IDHwt	Subgrupo I	23/03/2005	18/07/2006	16,1
H08	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	28/07/2006	05/05/2007	9,4
H09	A III	AA IDHmut	Subgrupo III	23/09/2006	14/10/2007	12,9
H10	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	27/09/2006	13/05/2009	32,0
H11	A II	AD IDHmut	Subgrupo III	06/11/2006	06/11/2011	60,9
H12	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	29/11/2006	30/10/2008	23,4
H13	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	22/02/2007	02/03/2007	0,3
H15	GBM	GBM IDHmut	Subgrupo II	07/05/2007	05/11/2007	6,1
H16	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	12/09/2007	12/09/2009	24,4
H17	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	07/09/2011	15/09/2011	0,3
H18	O III	AA IDHwt	Subgrupo I	26/09/2011	21/03/2013	18,1
H19	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	27/01/2012	24/06/2012	5,0
H20	A III	AA IDHwt	Subgrupo I	29/02/2012	28/04/2012	2,0
H21	O III	AA IDHmut	Subgrupo III	06/06/2012	04/05/2013	11,1
H22	O III	OA	Subgrupo III	25/06/2012	17/09/2013	15,0
H23	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	27/06/2012	22/01/2013	7,0
H24	A III	AA IDHwt	Subgrupo I	03/07/2012	27/10/2012	3,9
H25	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	04/07/2012	10/10/2012	3,3
H26	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	08/08/2012	01/04/2013	7,9
H27	O II	AD IDHmut	Subgrupo III	31/08/2012	19/11/2016	51,4
H28	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	03/09/2012	03/01/2013	4,1
H29	O II	O	Subgrupo III	08/11/2012	09/01/2013	2,1
H30	A III	AA IDHmut	Subgrupo III	04/03/2013	15/08/2013	5,5

H31	A III	AA IDHmut	Subgrupo III	26/07/2013	26/10/2013	3,1
H32	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	21/02/2014	28/08/2014	6,3
H34	A II	AD IDHmut	Subgrupo III	22/04/2014	26/09/2017	41,8
H35	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	14/05/2014	21/03/2015	10,4
H36	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	11/06/2014	06/08/2014	1,9
H37	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	22/07/2014	23/08/2014	1,1
H38	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	28/07/2014	22/09/2014	1,9
H39	UG	AD IDHmut	Subgrupo III	19/08/2014	29/04/2018	45,0
H40	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	25/08/2014	04/12/2014	3,4
H41	A III	AA IDHwt	Subgrupo I	30/09/2014	23/12/2015	15,0
H42	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	25/11/2014	13/07/2015	7,7
H43	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	13/05/2015	07/01/2016	8,0
H44	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	20/05/2015	25/05/2015	0,2
H45	O III	AA IDHmut	Subgrupo III	12/07/2010	15/10/2010	3,2
H46	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	04/06/2010	15/06/2010	0,4
H47	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	21/08/2008	31/07/2009	11,5
H48	A III	AA IDHmut	Subgrupo III	15/09/2008	13/12/2008	3,0
H49	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	17/09/2008	11/10/2009	13,0
H50	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	30/09/2008	04/11/2008	1,2
M7463	G III	AA IDHwt	Subgrupo I	13/09/2018	13/05/2019	8,1
M7464	GBM	GBM IDHmut	Subgrupo II	05/09/2018	02/05/2019	8,0
M7465	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	12/09/2018	15/05/2019	8,2
M7545	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	18/09/2018	30/05/2019	8,5
M7558	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	24/09/2018	24/09/2019	12,2
M7698	GBM	GBM IDHmut	Subgrupo II	01/10/2018	07/05/2019	7,3
M7816	GBM	GBM IDHwt	Subgrupo I	01/10/2018	28/05/2019	8,0
M8376	G III/IV	GBM IDHwt	Subgrupo I	08/01/2019	07/05/2019	4,0
M8597	O III	AA IDHmut	Subgrupo III	05/02/2019	02/07/2021	29,3
M8961	O II	GBM IDHmut	Subgrupo II	08/02/2019	08/05/2019	3,0

GBM: glioblastoma. A: astrocitoma. O: oligodendroglioma. OA: oligodendroglioma anaplásico. G: glioma. UG: sin clasificar (del inglés *unknown glioma*). AD: astrocitoma difuso. AA: astrocitoma anaplásico. mut: mutado. wt: *wild-type*. OS: supervivencia global (del inglés *overall survival*)

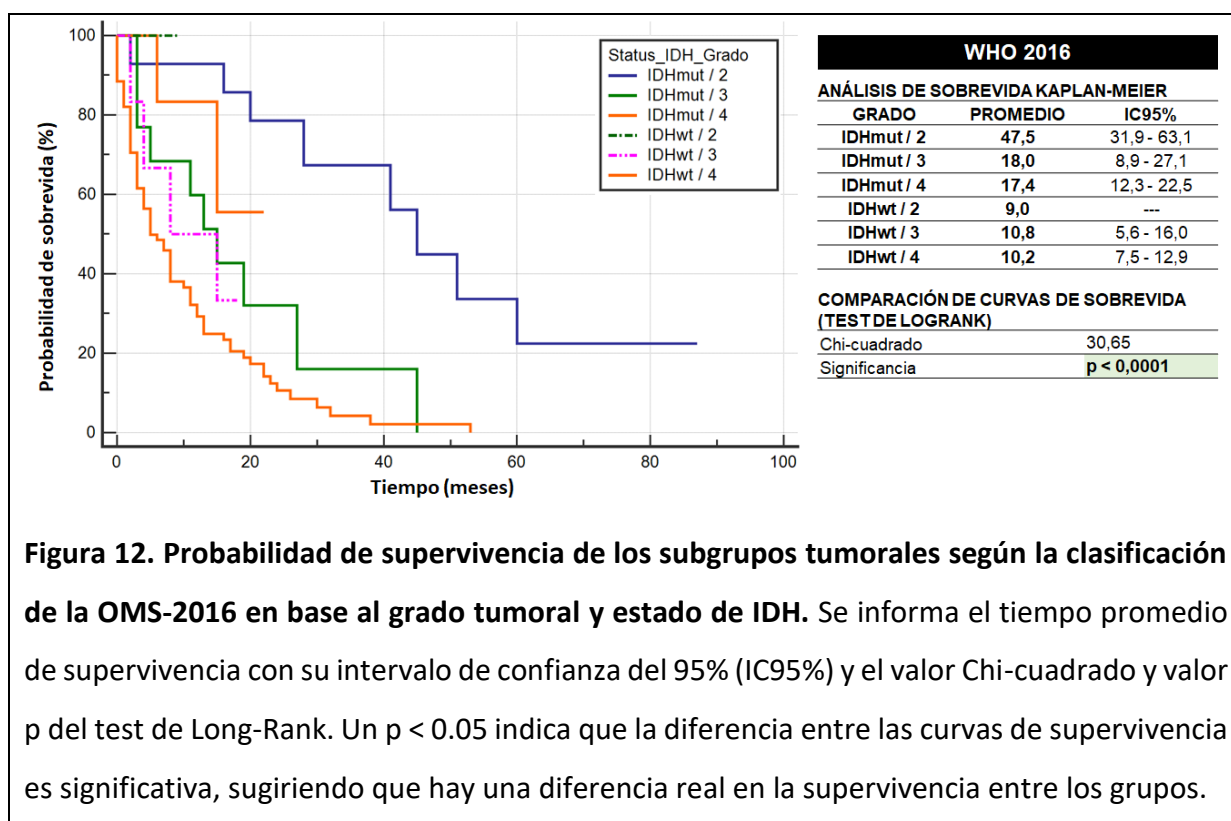
La FIGURA 11 muestra las curvas de supervivencia global (OS, del inglés *overall survival*) tanto para la clasificación de OMS-2007 como la de OMS-2016 de los gliomas. Se observó que ambas clasificaciones tuvieron un valor pronóstico para la OS principal en todos los grupos. El subgrupo histológico asociado con una supervivencia global más prolongada fue el glioma de grado II (OS 2007-OMS: 35,6 meses y OS 2016-OMS: 47,7 meses). Por el contrario, el glioma

de grado 4 (glioblastoma) fue el subgrupo asociado con un peor pronóstico (OS 2007-OMS: 10,4 meses y OS 2016-OMS: 11,1 meses).



Estos resultados validaron el tamaño y la representatividad de cada subgrupo molecular de gliomas para estudios futuros. Además, la precisión introducida por los biomarcadores moleculares (estado de IDH y presencia de la CD-1p/19q) permitió una mejor clasificación diagnóstica y pronóstica de los pacientes con gliomas.

La FIGURA 12 muestra la curva de OS de los subgrupos de grado tumoral con respecto a su estado IDH. Para todos los subgrupos, los tumores IDHmut se asociaron con un mejor pronóstico en comparación con los tumores IDHwt (grado 2: OS-IDHmut: 47,5 meses frente a OS-IDHwt: 9,0 meses; grado 3: subgrupos OS-IDHmut: 18,0 meses frente a la OS-IDHwt: 10,8 meses; grado 4: OS-IDHmut: 17,4 meses frente a la OS-IDHwt: 10,2 meses).



En base a los resultados de OS, se podrían definir nuevos subgrupos tumorales:

- **subgrupo 1:** tumores IDHwt con grado 3 y 4 (astrocitoma anaplásico IDHwt y glioblastoma IDHwt)
- **subgrupo 2:** tumores IDHmut con grado 4 (glioblastoma IDHmut)
- **subgrupo 3:** tumores IDHmut con grado 2 y 3 (oligodendroglioma IDHmut, CD-1p/19q, astrocitoma difuso IDHmut, oligodendroglioma anaplásico IDHmut, CD-1p/19q y astrocitoma anaplásico IDHmut)

La FIGURA 13 muestra la curva de OS de estos subgrupos tumorales con respecto a su estado OS, donde se observa un mejor pronóstico para el subgrupo III (OS-III: 34,7 meses) que incluye a los tumores IDHmut con grado 2 y 3, y peor pronóstico para el subgrupo I (OS-I: 10,5 meses)

que abarca los tumores IDHwt con grado 3 y 4. Se incluye un subgrupo intermedio (subgrupo II) para los glioblastomas IDHmut con OS intermedia (OS-II: 17,4 meses).

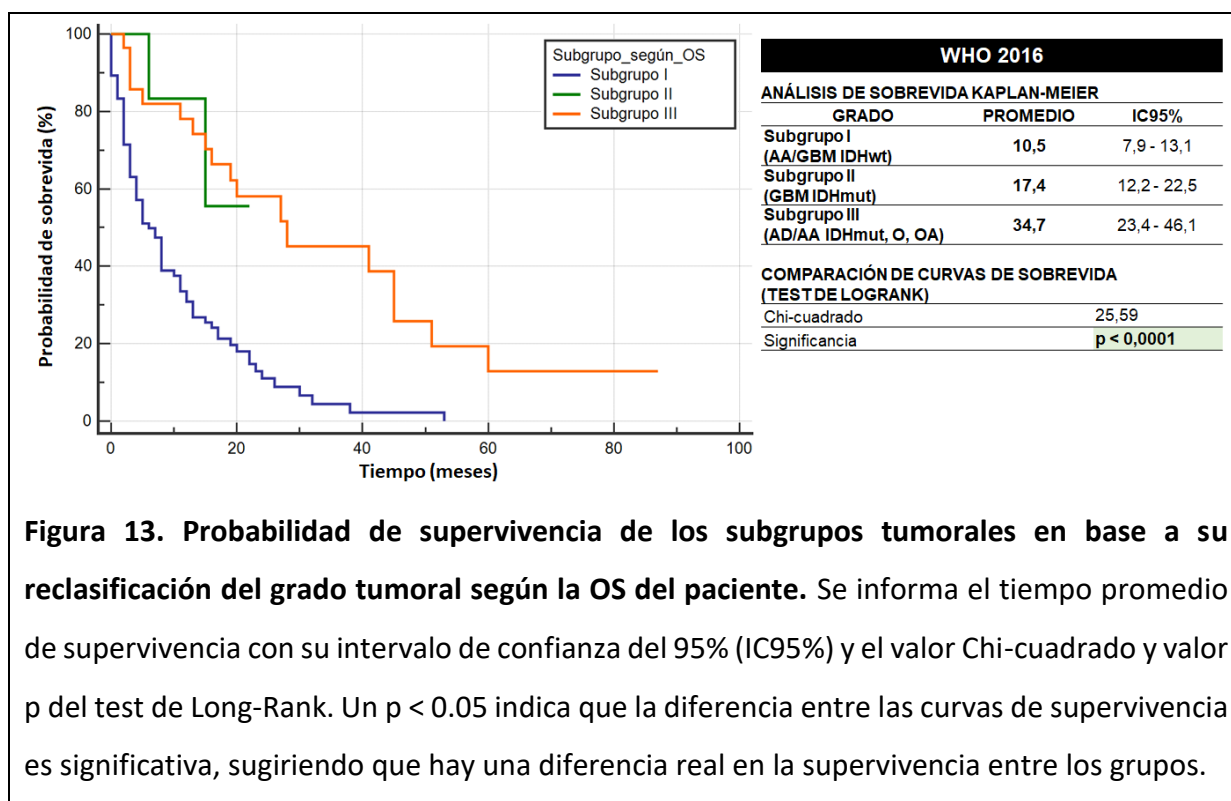


Figura 13. Probabilidad de supervivencia de los subgrupos tumorales en base a su reclasificación del grado tumoral según la OS del paciente. Se informa el tiempo promedio de supervivencia con su intervalo de confianza del 95% (IC95%) y el valor Chi-cuadrado y valor p del test de Long-Rank. Un $p < 0.05$ indica que la diferencia entre las curvas de supervivencia es significativa, sugiriendo que hay una diferencia real en la supervivencia entre los grupos.

3.3. Alteraciones moleculares en los genes relacionados a la gliomagénesis

Como indicamos anteriormente, la gliomagénesis es un proceso complejo que implica la acumulación de mutaciones en genes clave que regulan el ciclo celular, la reparación del ADN, la proliferación y la diferenciación celular. La integración de datos genómicos en la práctica clínica ha revolucionado no solo su clasificación y manejo, sino que abrió nuevas vías para terapias personalizadas. Entre las alteraciones más relevantes se encuentran las mutaciones en los genes PDGFRA, EGFR, CDKN2A/B, PTEN, CDK4, MDM2, NFKBIA y TP53. Además, alteraciones epigenéticas, como la metilación del promotor de MGMT, influyen en la respuesta a la quimioterapia. Con el objetivo de estudiar estos genes se procedió a los 119 casos realizar la técnica de MLPA (Probemix P105 y ME012).

3.3.1. Análisis del pMGMT

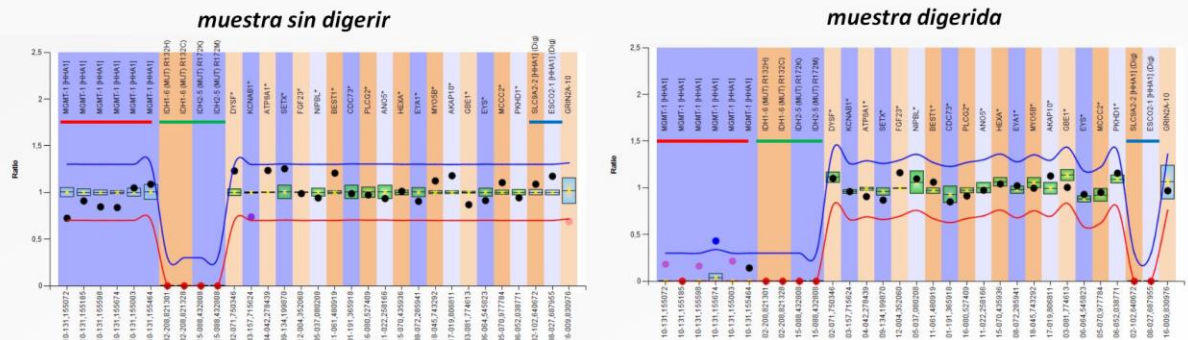
La FIGURA 14 muestra las gráficas obtenidas a partir de técnica MLPA para tres glioblastomas IDHwt (Glio 01, Glio 02 y H38).

Para el paciente Glio 01:

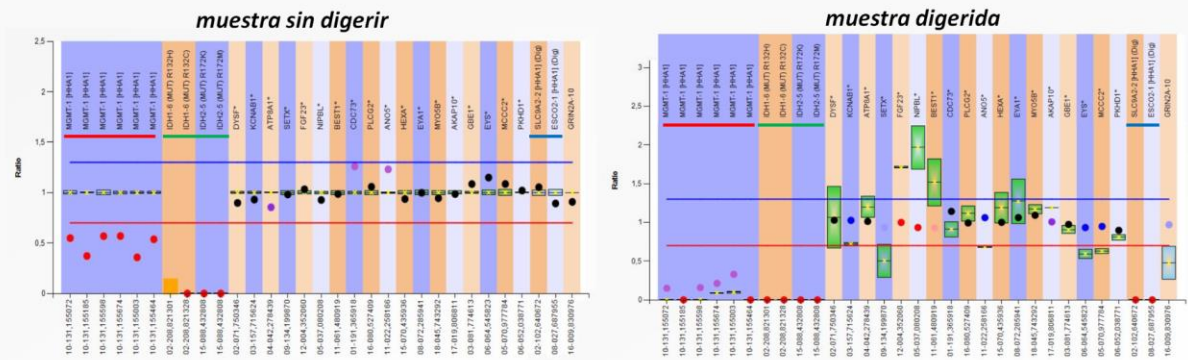
- a partir de la muestra sin digerir, se puede inferir que el tumor no presenta las mutaciones IDH1-R132H/R132C o IDH2-R172K/R172M y posee un número normal de copias en el pMGMT (*ratio*: 0,95).
- a partir de la muestra digerida, se observa digestión de las sondas MS-MLPA del pMGMT (*ratio*: 0,18) y control de digestión (*ratio*: 0,00).

En conclusión, Glio 01 es un tumor IDHwt que presenta escasa metilación del pMGMT (18% de metilación) lo cual indicaría escaso silenciamiento génico que da lugar a niveles casi normales de la proteína. Esto permite pronosticar una ineficaz acción de la TMZ sobre las células tumorales y menor OS del paciente.

Glio 01



Glio 02



H38

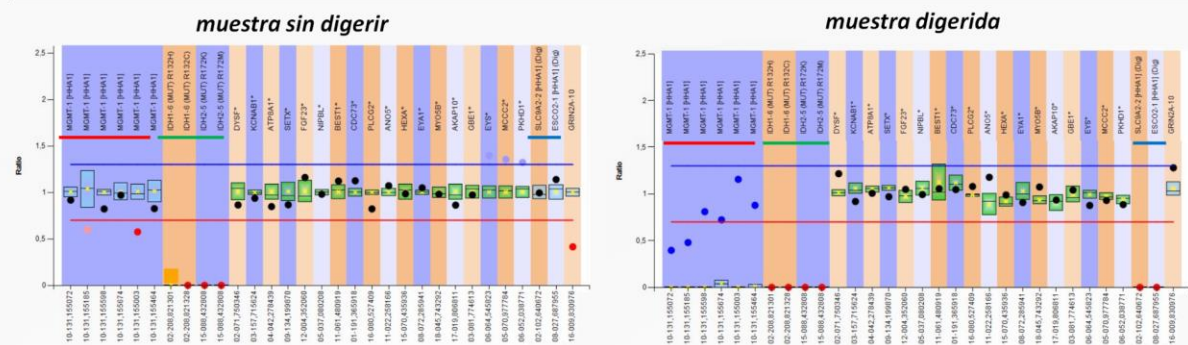


Figura 14. Gráficas obtenidas para muestras de 3 glioblastomas IDHwt. La línea roja identifica las sondas MS-MLPA que hibridan en la región promotora del gen MGMT, la línea verde aquellas que permiten detectar mutaciones puntuales más comunes de los genes IDH1 (R132H y R132C) e IDH2 (R172K y R172M), y la línea azul las sondas controles de digestión enzimática.

Para el paciente Glio 02:

- a partir de la muestra sin digerir, se puede inferir que el tumor no presenta las mutaciones IDH1-R132H/R132C o IDH2-R172K/R172M y posee un estado de ploidía anormal (deleción de un alelo) en el pMGMT (*ratio*: 0,51).
- a partir de la muestra digerida, se observa digestión de las sondas MS-MLPA del pMGMT (*ratio*: 0,14) y control de digestión (*ratio*: 0,00).

En conclusión, Glio 02 es un tumor IDHwt, con deleción heterocigota y escasa metilación del pMGMT (14% de metilación). Al igual que el caso anterior, se pronostica una ineficaz acción de la TMZ sobre las células tumorales y menor OS del paciente.

Para el paciente H38:

- a partir de la muestra sin digerir, se puede inferir que el tumor no presenta las mutaciones IDH1-R132H/R132C o IDH2-R172K/R172M y posee un número normal de copias en el pMGMT (*ratio*: 0,81).
- a partir de la muestra digerida, se observa digestión de las sondas MS-MLPA del pMGMT (*ratio*: 0,74) y control de digestión (*ratio*: 0,00).

En conclusión, H38 es un tumor IDHwt, con deleción heterocigota y alta metilación del pMGMT (74% de metilación). A diferencia de los casos anteriores, existiría silenciamiento génico que da lugar a niveles reducidos de la proteína. Esto permite pronosticar una acción de la TMZ eficaz sobre las células tumorales y mayor OS del paciente.

Los resultados del número de copias y estados de metilación para el pMGMT de los 119 gliomas de la cohorte en estudio se detallan en la TABLA 10.

La FIGURA 15 muestra la curva de OS entre los subgrupos según su estado IDH con respecto a la metilación del pMGMT (se considera que el promotor está metilado cuando en el ensayo de MS-MLPA el $r > 25\%$). Cuando se comparan los subgrupos (estado IDH), los tumores con metilación en el pMGMT se asociaron con un mejor pronóstico en comparación con los

tumores no metilados (IDHmut: OS-pMGMT_{met} 34,5 meses frente a OS-pMGMT_{no-met} 21,2 meses; IDH_{wt}: OS-pMGMT_{met} 11,1 meses frente a OS-pMGMT_{no-met} 10,4 meses).

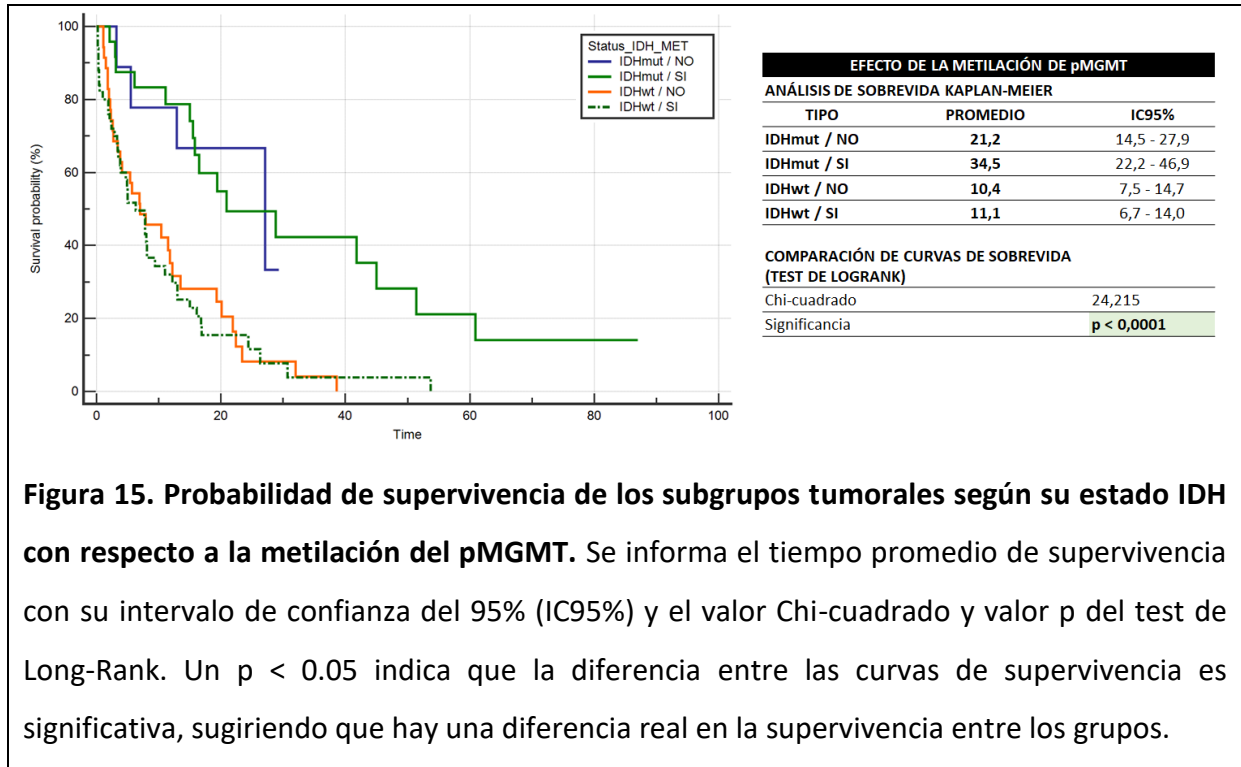
1

TABLA 10. Presencia de delección y estado de metilación (porcentaje) para el pMGMT en los 119 gliomas.

	O IDHmut y CD-1p19q					AD IDHmut										AD IDHwt						
	Glio 09	H29	G28	G27	Glio 05	Glio 15	Glio 06	H27	Glio 13	G19	H11	H39	H34	G35	Glio 21							
DELECIÓN	NO	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	SI							
% metilación	32%	38%	72%	76%	88%	8%	25%	37%	40%	41%	41%	66%	75%	77%	19%							
	OA IDHmut y CD-1p19q			AA IDHmut						AA IDHwt												
	G20	H22	Glio 22	H20	H18	M7463	H06	H41	H24	Glio 19	H09	G25	H30	H45	M8597	H48	Glio 04	H21	H31			
DELECIÓN	NO	NO	NO	SI	NO	NO	NO	NO	SI	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	SI	SI	NO			
% metilación	52%	66%	79%	33%	47%	49%	66%	91%	15%	11%	12%	15%	19%	23%	24%	33%	34%	38%	52%			
	M8961	Glio 08	M7464	H15	Glio 16	Glio 07	M7698	H35	Glio 20	M7816	G23	G30	H28	G33	G32	G45	Glio 02	Glio 10	G46			
	GBM IDHmut							GBM IDHwt														
DELECIÓN	NO	SI	SI	NO	SI	NO	SI	SI	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	SI	NO			
% metilación	26%	16%	42%	58%	63%	81%	12%	0%	1%	1%	7%	9%	11%	12%	14%	14%	14%	14%	15%			
	Glio 18	H01	G22	G43	G44	Glio 01	H37	G49	H23	H47	M7465	G09	H10	H26	G37	H12	G36	H50	H02			
	GBM IDHwt																					
DELECIÓN	SI	NO	SI	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	SI	NO	NO	NO	NO	SI	NO	NO	NO			
% metilación	16%	16%	17%	18%	18%	18%	18%	19%	19%	19%	19%	20%	20%	20%	21%	21%	22%	22%	23%			
	G18	M7558	G40	H05	Glio 12	H08	G12	H19	G39	H32	G10	H13	G42	H03	H40	H16	H17	G31	H42			
	GBM IDHwt																					
DELECIÓN	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	NO	SI	SI	NO	SI	NO	NO	NO	NO	SI	SI	SI			
% metilación	24%	24%	25%	25%	27%	27%	29%	29%	30%	30%	31%	33%	34%	34%	35%	35%	35%	36%	37%			

	M7545	G11	G48	H49	G47	Glio 03	Glio 14	G21	G26	H43	G29	G01	G16	G24	Glio 11	G02	H25	H38	G14
	GBM IDHwt																		
DELECIION	SI	NO	NO	NO	NO	SI	SI	NO	NO	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	NO
% metilación	37%	40%	40%	43%	46%	49%	50%	52%	53%	55%	56%	62%	63%	64%	65%	67%	68%	74%	83%
	H36	H46	M8376	H44	G03	G15	G17	G05	G08										
	GBM IDHwt																		
DELECIION	SI	SI	SI	SI	NO	NO	NO	NO	NO										
% metilación	85%	89%	102%	104%	106%	108%	120%	106%	100%										

O: oligodendroglioma. OA: oligodendroglioma anaplásico. AD: astrocitoma difuso. AA: astrocitoma anaplásico. GBM: glioblastoma. mut: mutado. wt: salvaje o *wild type*.



Debido a que la metodología utilizada permite determinar el número de copias en la región promotora, se analizó la OS entre los subgrupos según su estado IDH (mutado o no mutado) con respecto a la presencia de delección en la región del pMGMT (se considera que el promotor está delecionado cuando en el ensayo de MLPA el *ratio* < 50%). La FIGURA 16 muestra la curva de OS. Cuando se comparan los subgrupos (estado IDH), los tumores con delección en el pMGMT se asociaron con un peor pronóstico en comparación con los tumores sin delección (IDHmut: OS-pMGMT_{DEL} 21,6 meses frente a OS-pMGMT_{NO-DEL} 37,6 meses; IDHwt: OS-pMGMT_{DEL} 10,0 meses frente a OS-pMGMT_{NO-DEL} 11,0 meses).

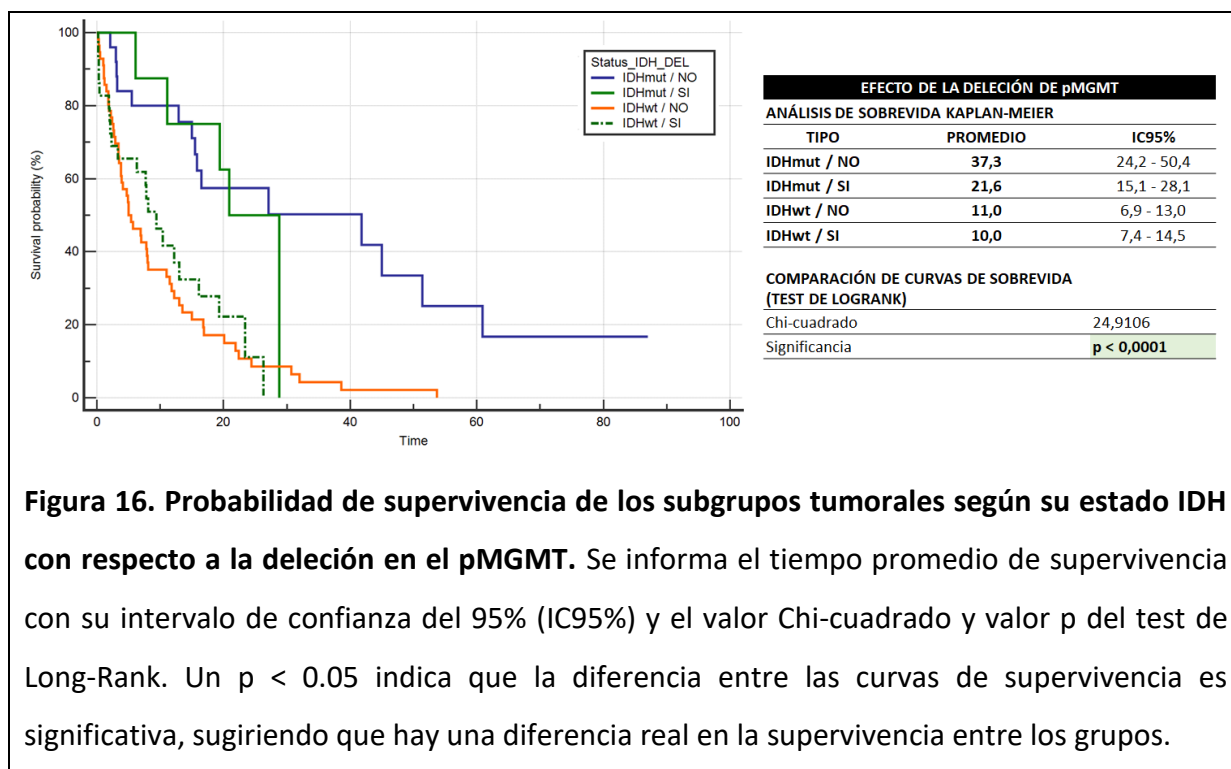


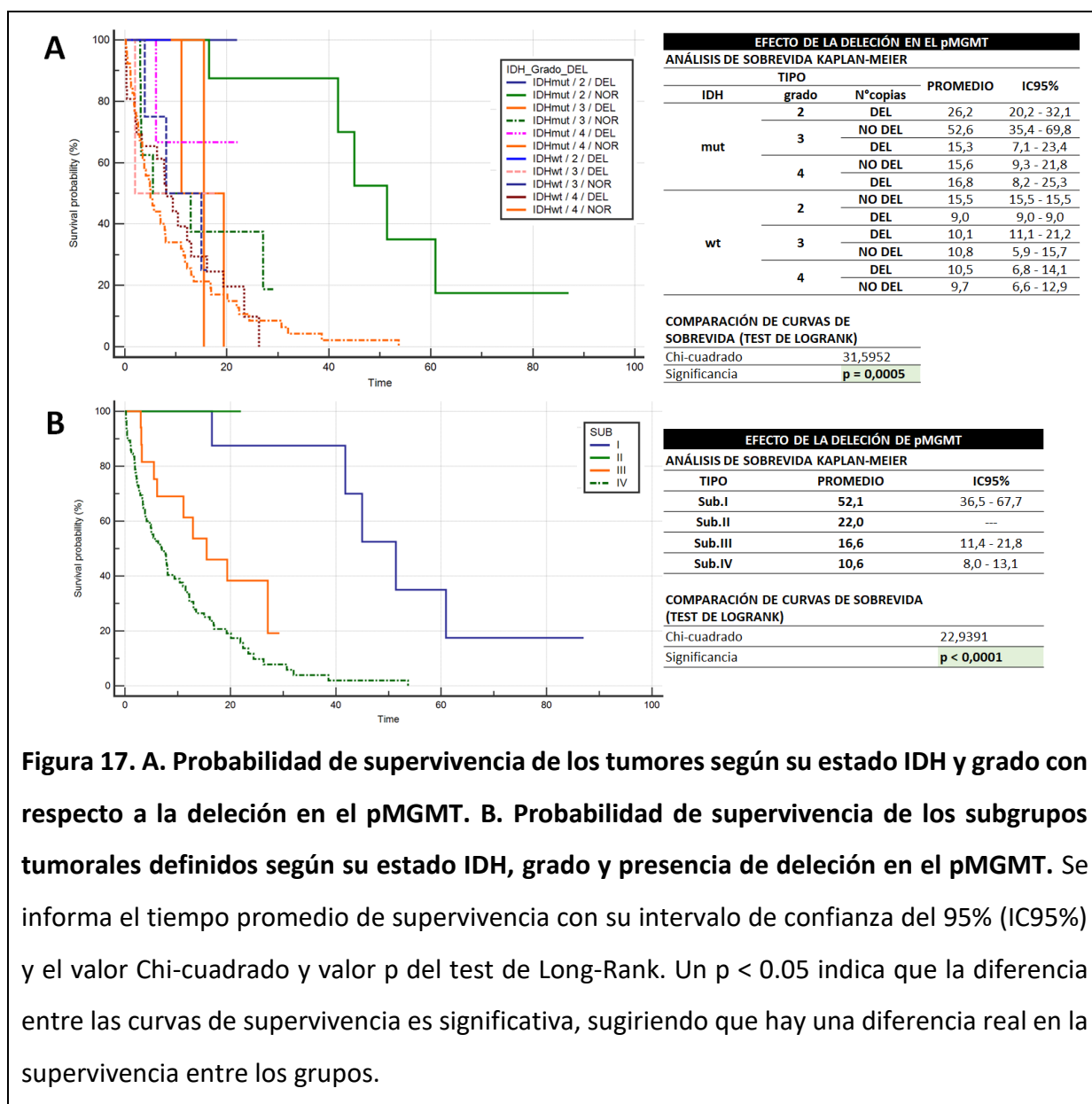
Figura 16. Probabilidad de supervivencia de los subgrupos tumorales según su estado IDH con respecto a la delección en el pMGMT. Se informa el tiempo promedio de supervivencia con su intervalo de confianza del 95% (IC95%) y el valor Chi-cuadrado y valor p del test de Long-Rank. Un $p < 0.05$ indica que la diferencia entre las curvas de supervivencia es significativa, sugiriendo que hay una diferencia real en la supervivencia entre los grupos.

Cuando se introduce el grado tumoral al estado IDH para evaluar el impacto del número de copias en el pMGMT como biomarcador pronóstico (FIGURA 17A) en **tumores astrocitarios**, se observa que, en base a los resultados de OS, se podrían definir nuevos subgrupos tumorales:

- **subgrupo I:** tumores IDHmut grado 2 (astrocitoma difuso IDHmut) con delección en pMGMT.
- **subgrupo II:** tumores IDHmut grado 3 (astrocitoma anaplásico IDHmut) sin delección en pMGMT.
- **subgrupo III:** tumores IDHmut grado 3 / 4 (astrocitoma anaplásico IDHmut y glioblastoma IDHmut)
- **subgrupo IV:** tumores IDHwt grado 2 / 3 / 4 (astrocitoma difuso IDHwt, astrocitoma anaplásico IDHwt y glioblastoma IDHwt).

La curva de OS de estos nuevos subgrupos tumorales (FIGURA 17B) permite determinar un mejor pronóstico para el subgrupo I (OS-I: 52,1 meses) que incluye a los tumores IDHmut/grado 2, y peor pronóstico para el subgrupo IV (OS-IV: 10,6 meses) que abarca los tumores IDHwt.

Estos resultados indicarían que la delección en el pMGMT podría ser un factor pronóstico en tumores de origen astrocitarios que presentan IDHmut.



3.3.2. Análisis del gen PTEN

La LOH ocurre cuando una región cromosómica pierde un alelo (generalmente el alelo normal de un gen supresor tumoral), dejando solo la copia mutada o delecionada. La LOH del brazo largo del cromosoma 10 (LOH 10q) es una alteración que ha sido descrita principalmente en glioblastomas IDHwt, y se asocia con mayor agresividad y resistencia a terapia [89]. El gen PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*), localizado en la región 10q23.31, es el principal gen

supresor tumoral afectado por LOH 10q en gliomas [90]. El gen PTEN se compone de 9 exones y codifica una fosfatasa que regula negativamente la vía PI3K/AKT/mTOR que controla la proliferación, supervivencia y crecimiento celular. Además, actúa como gen supresor de tumores [91]. La metodología más comúnmente utilizada para su estudio es la Hibridación Fluorescente *In Situ* (FISH) que utiliza sondas fluorescentes específicas para la región 10q23 y un control (por ejemplo, centrómero del cromosoma 10) [92]. Si bien es una técnica rápida, aplicable a tejido incluido en parafina, no permite cuantificar deleciones parciales del 10q y presenta una resolución limitada (no detecta deleciones <1 Mb).

La metodología MLPA permite determinar el número de copias (estado de ploidía) del gen PTEN, mediante 9 sondas MLPA (1 sonda para cada uno de los exones del gen). Esta técnica permite identificar pérdidas parciales o completas (no solo LOH 10q) presenta mayor sensibilidad para deleciones pequeñas (~50-100 kb). Para la interpretación de los resultados se consideró un *ratio* < 0,75 como indicativo de deleción parcial o total del gen PTEN. La FIGURA 18 muestra las gráficas obtenidas a partir de esta técnica para dos glioblastomas IDHwt (H10 y H15).

En la TABLA 11 se resumen la frecuencia de la alteración por entidad tumoral, mientras que los resultados del número de copias para el gen PTEN de los 119 gliomas de la cohorte en estudio se detallan en la TABLA 12.

TABLA 11. Frecuencia de alteraciones en el gen PTEN en los 119 gliomas.		
ENTIDAD	GRADO	N° CASOS Deleción / Totales
Astrocitoma difuso		
Astrocitoma difuso, IDHmut	2	0 / 9
Astrocitoma difuso, IDHwt	2	1 / 1
Astrocitoma anaplásico		
Astrocitoma anaplásico, IDHmut	3	2 / 6
Astrocitoma anaplásico, IDHwt	3	2 / 10
Glioblastoma		
Glioblastoma, IDHmut	4	5 / 7
Glioblastoma, IDHwt	4	41 / 78
Oligodendroglioma		
Oligodendroglioma, IDHmut y CD-1p/19q	2	0 / 5
Oligodendroglioma anaplásico		
Oligodendroglioma anaplásico, IDHmut y CD-1p/19q	3	0 / 3

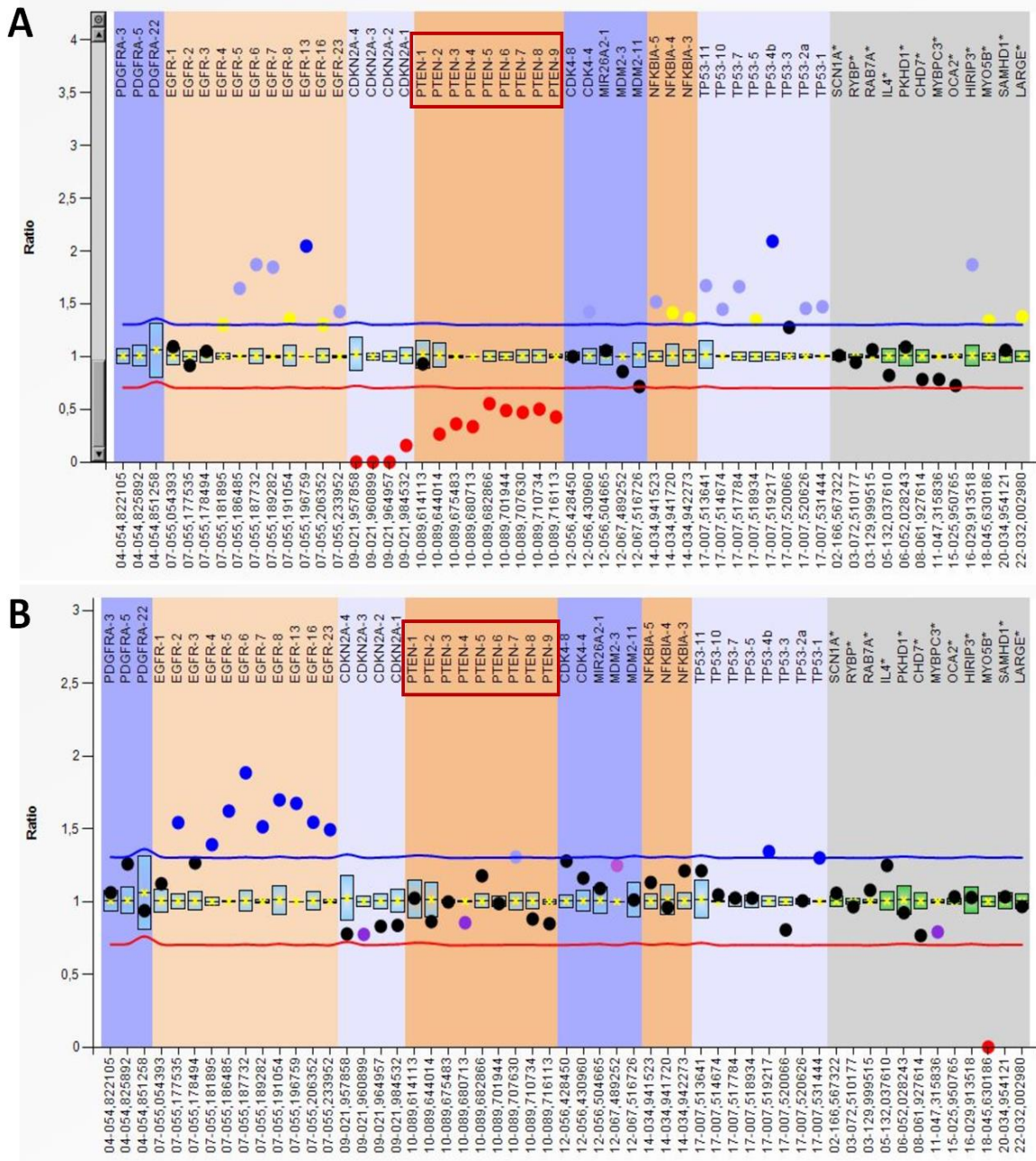


Figura 18. Gráficas obtenidas para muestras de 2 glioblastomas IDHwt. A. tumor con delección en el gen PTEN. B. tumor sin delección en el gen PTEN. El recuadro rojo identifica las 9 sondas MLPA que hibridan en cada uno de los 9 exones del gen PTEN.

1

TABLA 12. Presencia de delección del gen PTEN en los 119 gliomas.

	O IDHmut y CD-1p19q					AD IDHmut										AD IDHwt									
	Glio 09	H29	G28	G27	Glio 05	Glio 15	Glio 06	H27	Glio 13	G19	H11	H39	H34	G35	Glio 21										
PTEN (10q23.3)	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	DEL (0,47)										
	OA IDHmut y CD-1p19q			AA IDHmut							AA IDHwt														
	G20	H22	Glio 22	H20	H18	M7463	H06	H41	H24	Glio 19	H09	G25	H30	H45	M8597	H48	Glio 04	H21	H31						
PTEN (10q23.3)	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	DEL (0,65)	NOR	DEL (0,67)	NOR	NOR	NOR	NOR	DEL (0,68)	NOR	NOR	NOR	DEL (0,33)	NOR	NOR						
	M8961	Glio 08	M7464	H15	Glio 16	Glio 07	M7698	H35	Glio 20	M7816	G23	G30	H28	G33	G32	G45	Glio 02	Glio 10	G46						
	GBM IDHmut							GBM IDHwt																	
PTEN (10q23.3)	DEL (0,64)	NOR	NOR	DEL (0,48)	DEL (0,64)	DEL (0,53)	DEL (0,68)	DEL (0,59)	DEL (0,44)	NOR	NOR	DEL (0,43)	DEL (0,74)	DEL (0,63)	NOR	DEL (0,47)	NOR	DEL (0,25)	DEL (0,29)						
	Glio 18	H01	G22	G43	G44	Glio 01	H37	G49	H23	H47	M7465	G09	H10	H26	G37	H12	G36	H50	H02						
	GBM IDHwt																								
PTEN (10q23.3)	NOR	NOR	NOR	NOR	DEL (0,52)	DEL (0,50)	DEL (0,59)	NOR	NOR	NOR	NOR	DEL (0,55)	NOR	NOR	NOR	DEL (0,59)	DEL (0,54)	DEL (0,53)	DEL (0,83)						
	G18	M7558	G40	H05	Glio 12	H08	G12	H19	G39	H32	G10	H13	G42	H03	H40	H16	H17	G31	H42						
	GBM IDHwt																								
PTEN (10q23.3)	NOR	NOR	DEL (0,50)	DEL (0,65)	DEL (0,58)	DEL (0,40)	NOR	DEL (0,05)	DEL (0,38)	NOR	DEL (0,67)	DEL (0,27)	NOR	DEL (0,62)	NOR	NOR	DEL (0,63)	NOR	DEL (0,48)						
	M7545	G11	G48	H49	G47	Glio 03	Glio 14	G21	G26	H43	G29	G01	G16	G24	Glio 11	G02	H25	H38	G14						
	GBM IDHwt																								
PTEN (10q23.3)	DEL (0,55)	NOR	DEL (0,56)	DEL (0,54)	DEL (0,29)	DEL (0,42)	NOR	NOR	NOR	DEL (0,65)	NOR	NOR	NOR	DEL (0,05)	DEL (0,52)	DEL (0,44)	DEL (0,30)	NOR	DEL (0,23)						
	H36	H46	M8376	H44	G03	G15	G17	G05	G08																
	GBM IDH wt																								

PTEN (10q23.3)	DEL (0,70)	NOR	NOR	NOR	DEL (0,25)	NOR	NOR	NOR	DEL (0,54)	
---------------------------	-----------------------	-----	-----	-----	-----------------------	-----	-----	-----	-----------------------	--

O: oligodendroglioma. OA: oligodendroglioma anaplásico. AD: astrocitoma difuso. AA: astrocitoma anaplásico. GBM: glioblastoma. mut: mutado. wt: *wild-type*.

El gen MGMT, al igual que el gen PTEN, también se localiza en el 10q, pero se localiza en 10q26.3, mientras que PTEN está en 10q23.31 [93]. La pérdida de heterocigosidad (LOH) en 10q puede afectar a MGMT dependiendo de la extensión de la delección. De esta forma, si hay LOH 10q completa el tumor pierde una copia de los genes PTEN y MGMT, mientras que si la LOH 10q es parcial solo estaría afectado el gen PTEN. En la cohorte en estudio, observamos gliomas que presentan delección de ambos genes (TABLA 13).

TABLA 13. Presencia de delección en los genes PTEN y MGMT en los 119 gliomas.

	ID	PTEN (10q23.3)	pMGMT (10q26.3)		ID	PTEN (10q23.3)	pMGMT (10q26.3)
O IDHmut y CD-1p19q	Glio 09	NO	NO	GBM IDHwt	G49	NO	NO
O IDHmut y CD-1p19q	H29	NO	SI	GBM IDHwt	H23	NO	NO
O IDHmut y CD-1p19q	G28	NO	SI	GBM IDHwt	H47	NO	NO
O IDHmut y CD-1p19q	G27	NO	NO	GBM IDHwt	M7465	NO	SI
O IDHmut y CD-1p19q	Glio 05	NO	NO	GBM IDHwt	G09	SI	NO
AD IDHmut	Glio 15	NO	NO	GBM IDHwt	H10	NO	NO
AD IDHmut	Glio 06	NO	NO	GBM IDHwt	H26	NO	NO
AD IDHmut	H27	NO	SI	GBM IDHwt	G37	NO	NO
AD IDHmut	Glio 13	NO	NO	GBM IDHwt	H12	SI	SI
AD IDHmut	G19	NO	NO	GBM IDHwt	G36	SI	NO
AD IDHmut	H11	NO	NO	GBM IDHwt	H50	SI	NO
AD IDHmut	H39	NO	NO	GBM IDHwt	H02	SI	NO
AD IDHmut	H34	NO	NO	GBM IDHwt	G18	SI	NO
AD IDHmut	G35	NO	NO	GBM IDHwt	M7558	NO	SI
AD IDHwt	Glio 21	SI	SI	GBM IDHwt	G40	SI	NO
OA IDHmut y CD-1p19q	G20	NO	NO	GBM IDHwt	H05	SI	SI
OA IDHmut y CD-1p19q	H22	NO	NO	GBM IDHwt	Glio 12	SI	NO
OA IDHmut y CD-1p19q	Glio 22	NO	NO	GBM IDHwt	H08	SI	SI
AA IDHmut	H20	NO	SI	GBM IDHwt	G12	NO	NO
AA IDHmut	H18	NO	SI	GBM IDHwt	H19	SI	NO
AA IDHmut	M7463	SI	NO	GBM IDHwt	G39	SI	SI
AA IDHmut	H06	NO	NO	GBM IDHwt	H32	NO	SI
AA IDHmut	H41	SI	NO	GBM IDHwt	G10	SI	NO
AA IDHmut	H24	NO	NO	GBM IDHwt	H13	SI	SI
AA IDHwt	Glio 19	NO	NO	GBM IDHwt	G42	NO	NO
AA IDHwt	H09	NO	NO	GBM IDHwt	H03	SI	NO
AA IDHwt	G25	NO	NO	GBM IDHwt	H40	NO	NO
AA IDHwt	H30	SI	NO	GBM IDHwt	H16	NO	NO
AA IDHwt	H45	NO	NO	GBM IDHwt	H17	SI	SI
AA IDHwt	M8597	NO	NO	GBM IDHwt	G31	NO	SI
AA IDHwt	H48	NO	NO	GBM IDHwt	H42	SI	SI
AA IDHwt	Glio 04	SI	SI	GBM IDHwt	M7545	SI	SI
AA IDHwt	H21	NO	SI	GBM IDHwt	G11	NO	NO
AA IDHwt	H31	NO	NO	GBM IDHwt	G48	SI	NO
GBM IDHmut	M8961	SI	SI	GBM IDHwt	H49	SI	NO

GBM IDHmut	Glio 08	NO	SI
GBM IDHmut	M7464	NO	NO
GBM IDHmut	H15	SI	SI
GBM IDHmut	Glio 16	SI	NO
GBM IDHmut	Glio 07	SI	SI
GBM IDHmut	M7698	SI	NO
GBM IDHwt	H35	SI	NO
GBM IDHwt	Glio 20	SI	NO
GBM IDHwt	M7816	NO	NO
GBM IDHwt	G23	NO	NO
GBM IDHwt	G30	SI	NO
GBM IDHwt	H28	SI	NO
GBM IDHwt	G33	SI	NO
GBM IDHwt	G32	NO	NO
GBM IDHwt	G45	SI	NO
GBM IDHwt	Glio 02	NO	NO
GBM IDHwt	Glio 10	SI	SI
GBM IDHwt	G46	SI	NO
GBM IDHwt	Glio 18	NO	SI
GBM IDHwt	H01	NO	NO
GBM IDHwt	G22	NO	SI
GBM IDHwt	G43	NO	NO
GBM IDHwt	G44	SI	NO
GBM IDHwt	Glio 01	SI	NO
GBM IDHwt	H37	SI	NO
GBM IDHwt	G47	SI	NO
GBM IDHwt	Glio 03	SI	SI
GBM IDHwt	Glio 14	NO	SI
GBM IDHwt	G21	NO	NO
GBM IDHwt	G26	NO	NO
GBM IDHwt	H43	SI	NO
GBM IDHwt	G29	NO	SI
GBM IDHwt	G01	NO	NO
GBM IDHwt	G16	NO	SI
GBM IDHwt	G24	SI	NO
GBM IDHwt	Glio 11	SI	SI
GBM IDHwt	G02	SI	NO
GBM IDHwt	H25	SI	SI
GBM IDHwt	H38	NO	NO
GBM IDHwt	G14	SI	NO
GBM IDHwt	H36	SI	SI
GBM IDHwt	H46	NO	SI
GBM IDHwt	M8376	NO	SI
GBM IDHwt	H44	NO	SI
GBM IDHwt	G03	SI	NO
GBM IDHwt	G15	NO	NO
GBM IDHwt	G17	NO	SI
GBM IDHwt	G05	NO	NO
GBM IDHwt	G08	SI	NO

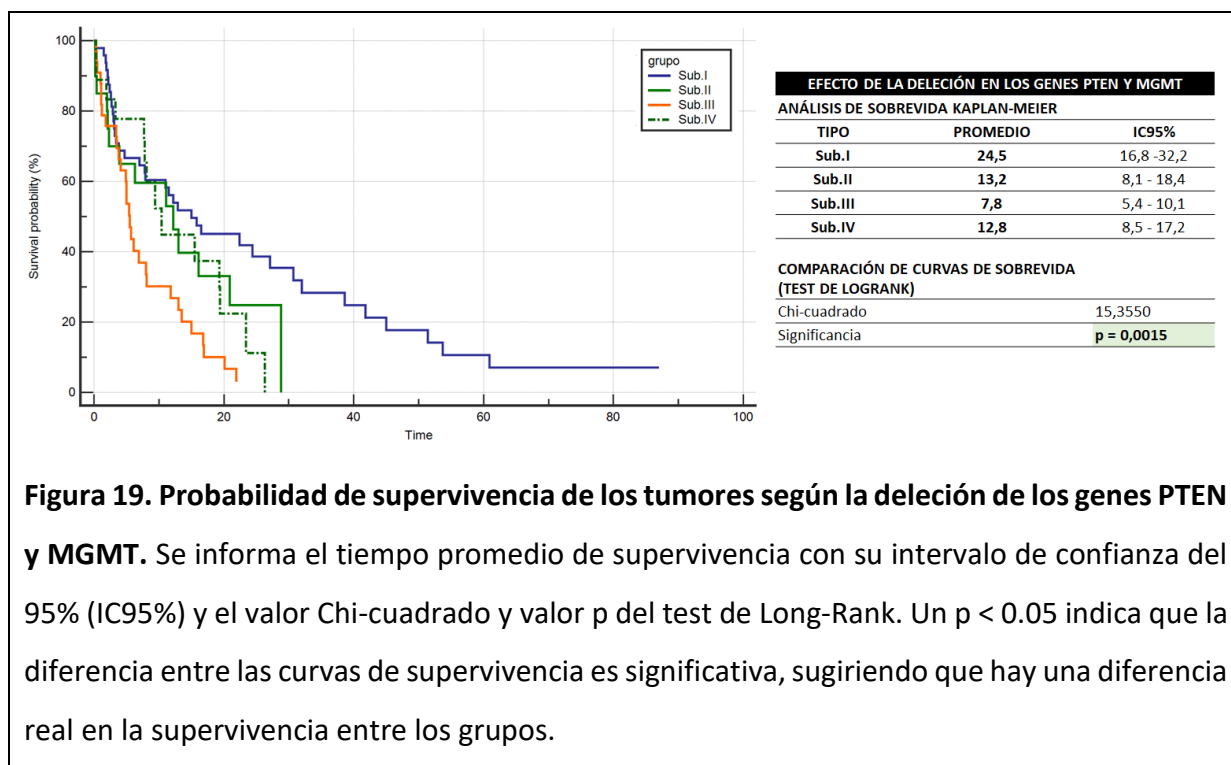
O: oligodendroglioma. OA: oligodendroglioma anaplásico. AD: astrocitoma difuso. AA: astrocitoma anaplásico. GBM: glioblastoma. mut: mutado. wt: *wild-type*.

En base a esto se puede distinguir 4 subgrupos tumorales:

- **subgrupo I:** tumores sin delección en los genes PTEN y MGMT.
- **subgrupo II:** tumores solo con delección en el gen MGMT.
- **subgrupo III:** tumores solo con delección en el gen PTEN.
- **subgrupo IV:** tumores con delección en los genes PTEN y MGMT

La curva de OS de estos subgrupos tumorales (FIGURA 19) permite determinar un mejor pronóstico para el subgrupo I (OS-I: 24,5 meses) que incluye a los tumores sin delección de los genes en estudio y peor pronóstico para el subgrupo III (OS-IV: 7,8 meses) que abarca los tumores solo con delección PTEN. Además, se puede observar OS similares para aquellos tumores sin delección en el gen PTEN independientemente si el gen MGMT se encuentra delecionado o no.

Estos resultados indicarían que la delección en el gen PTEN podría ser un factor pronóstico independiente para los tumores gliales.



Debido a que la delección del pMGMT no tendría un impacto significativo en el pronóstico del paciente, quisimos evaluar si el estado de metilación podría ser un biomarcador concomitante a la delección del gen PTEN en cuando la OS del paciente. Los datos para la cohorte en estudio se muestran en la TABLA 14.

TABLA 14. Presencia de delección en el gen PTEN y estado de metilación del pMGMT en los 119 gliomas.

	ID	PTEN (10q23.3)	pMGMT MET		ID	PTEN (10q23.3)	pMGMT MET
O IDHmut y CD-1p19q	Glio 09	NO	SI	GBM IDHwt	G49	NO	NO
O IDHmut y CD-1p19q	H29	NO	SI	GBM IDHwt	H23	NO	NO
O IDHmut y CD-1p19q	G28	NO	SI	GBM IDHwt	H47	NO	NO
O IDHmut y CD-1p19q	G27	NO	SI	GBM IDHwt	M7465	NO	NO
O IDHmut y CD-1p19q	Glio 05	NO	SI	GBM IDHwt	G09	SI	NO
AD IDHmut	Glio 15	NO	NO	GBM IDHwt	H10	NO	NO
AD IDHmut	Glio 06	NO	NO	GBM IDHwt	H26	NO	NO
AD IDHmut	H27	NO	SI	GBM IDHwt	G37	NO	NO
AD IDHmut	Glio 13	NO	SI	GBM IDHwt	H12	SI	NO
AD IDHmut	G19	NO	SI	GBM IDHwt	G36	SI	NO
AD IDHmut	H11	NO	SI	GBM IDHwt	H50	SI	NO
AD IDHmut	H39	NO	SI	GBM IDHwt	H02	SI	NO
AD IDHmut	H34	NO	SI	GBM IDHwt	G18	SI	NO
AD IDHmut	G35	NO	SI	GBM IDHwt	M7558	NO	NO
AD IDHwt	Glio 21	SI	NO	GBM IDHwt	G40	SI	NO
OA IDHmut y CD-1p19q	G20	NO	SI	GBM IDHwt	H05	SI	NO

OA IDHmut y CD-1p19q	H22	NO	SI
OA IDHmut y CD-1p19q	Glio 22	NO	SI
AA IDHmut	H20	NO	NO
AA IDHmut	H18	NO	SI
AA IDHmut	M7463	SI	SI
AA IDHmut	H06	NO	SI
AA IDHmut	H41	SI	SI
AA IDHmut	H24	NO	SI
AA IDHwt	Glio 19	NO	NO
AA IDHwt	H09	NO	NO
AA IDHwt	G25	NO	NO
AA IDHwt	H30	SI	NO
AA IDHwt	H45	NO	NO
AA IDHwt	M8597	NO	NO
AA IDHwt	H48	NO	NO
AA IDHwt	Glio 04	SI	SI
AA IDHwt	H21	NO	SI
AA IDHwt	H31	NO	SI
GBM IDHmut	M8961	SI	NO
GBM IDHmut	Glio 08	NO	NO
GBM IDHmut	M7464	NO	SI
GBM IDHmut	H15	SI	SI
GBM IDHmut	Glio 16	SI	SI
GBM IDHmut	Glio 07	SI	SI
GBM IDHmut	M7698	SI	SI
GBM IDHwt	H35	SI	NO
GBM IDHwt	Glio 20	SI	NO
GBM IDHwt	M7816	NO	NO
GBM IDHwt	G23	NO	NO
GBM IDHwt	G30	SI	NO
GBM IDHwt	H28	SI	NO
GBM IDHwt	G33	SI	NO
GBM IDHwt	G32	NO	NO
GBM IDHwt	G45	SI	NO
GBM IDHwt	Glio 02	NO	NO
GBM IDHwt	Glio 10	SI	NO
GBM IDHwt	G46	SI	NO
GBM IDHwt	Glio 18	NO	NO
GBM IDHwt	H01	NO	NO
GBM IDHwt	G22	NO	NO
GBM IDHwt	G43	NO	NO
GBM IDHwt	G44	SI	NO
GBM IDHwt	Glio 01	SI	NO
GBM IDHwt	H37	SI	NO

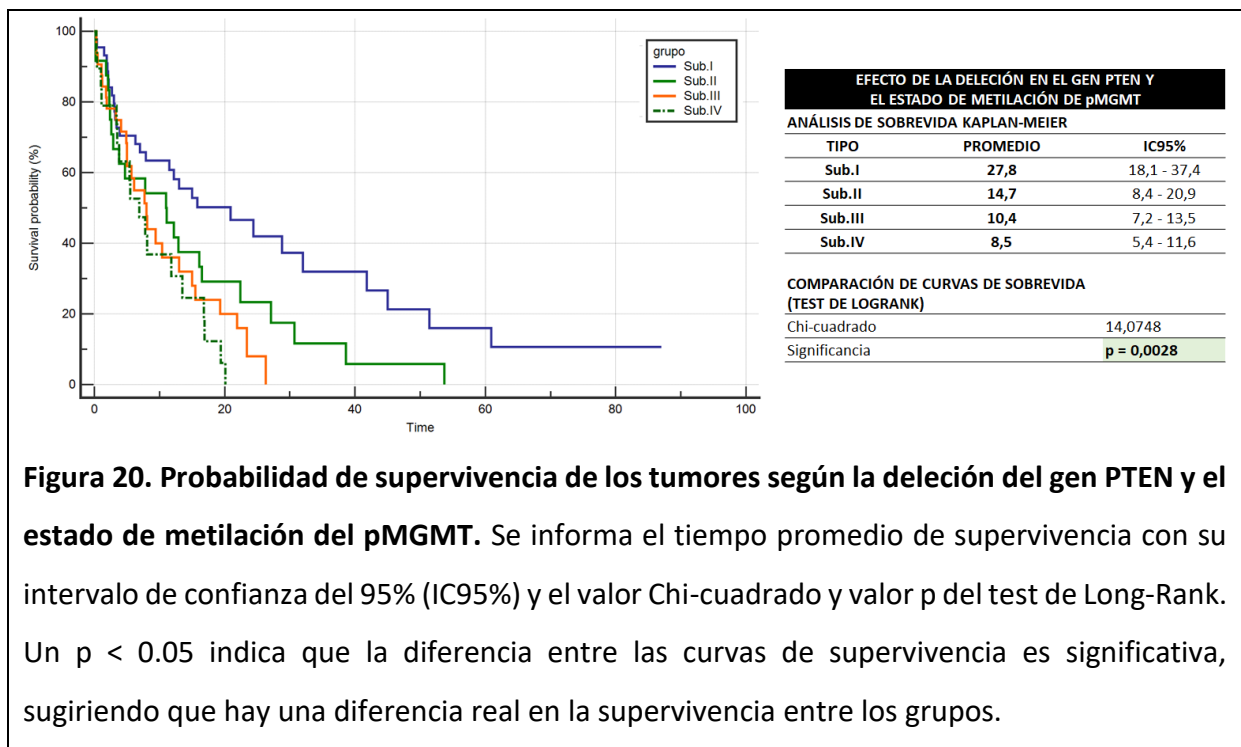
GBM IDHwt	Glio 12	SI	SI
GBM IDHwt	H08	SI	SI
GBM IDHwt	G12	NO	SI
GBM IDHwt	H19	SI	SI
GBM IDHwt	G39	SI	SI
GBM IDHwt	H32	NO	SI
GBM IDHwt	G10	SI	SI
GBM IDHwt	H13	SI	SI
GBM IDHwt	G42	NO	SI
GBM IDHwt	H03	SI	SI
GBM IDHwt	H40	NO	SI
GBM IDHwt	H16	NO	SI
GBM IDHwt	H17	SI	SI
GBM IDHwt	G31	NO	SI
GBM IDHwt	H42	SI	SI
GBM IDHwt	M7545	SI	SI
GBM IDHwt	G11	NO	SI
GBM IDHwt	G48	SI	SI
GBM IDHwt	H49	SI	SI
GBM IDHwt	G47	SI	SI
GBM IDHwt	Glio 03	SI	SI
GBM IDHwt	Glio 14	NO	SI
GBM IDHwt	G21	NO	SI
GBM IDHwt	G26	NO	SI
GBM IDHwt	H43	SI	SI
GBM IDHwt	G29	NO	SI
GBM IDHwt	G01	NO	SI
GBM IDHwt	G16	NO	SI
GBM IDHwt	G24	SI	SI
GBM IDHwt	Glio 11	SI	SI
GBM IDHwt	G02	SI	SI
GBM IDHwt	H25	SI	SI
GBM IDHwt	H38	NO	SI
GBM IDHwt	G14	SI	SI
GBM IDHwt	H36	SI	SI
GBM IDHwt	H46	NO	SI
GBM IDHwt	M8376	NO	SI
GBM IDHwt	H44	NO	SI
GBM IDHwt	G03	SI	SI
GBM IDHwt	G15	NO	SI
GBM IDHwt	G17	NO	SI
GBM IDHwt	G05	NO	SI
GBM IDHwt	G08	SI	SI

O: oligodendroglioma. OA: oligodendroglioma anaplásico. AD: astrocitoma difuso. AA: astrocitoma anaplásico. GBM: glioblastoma. mut: mutado. wt: *wild type*.

En base a esto se puede distinguir 4 subgrupos tumorales:

- **subgrupo I:** tumores sin delección en el gen PTEN y el pMGMT metilado.
- **subgrupo II:** tumores sin delección en el gen PTEN y el pMGMT no metilado.
- **subgrupo III:** tumores con delección en el gen PTEN y el pMGMT metilado.
- **subgrupo IV:** tumores con delección en el gen PTEN y el pMGMT no metilado.

La curva de OS de estos subgrupos tumorales (FIGURA 20) permite determinar un mejor pronóstico para el subgrupo I (OS-I: 27,8 meses) que incluye a los tumores sin delección del gen PTEN y pMGMT metilado, y peor pronóstico para el subgrupo IV (OS-IV: 8,5 meses) que abarca los tumores con delección PTEN y pMGMT no metilado. Además, se puede observar OS no estadísticamente significativos para los subgrupos II y III.



Estos datos indican que cuando las alteraciones (delección en el gen PTEN con delección en pMGMT o delección en el gen PTEN con el pMGMT no metilado) coexisten en un glioma, se puede identificar un subgrupo de alto riesgo que presenta tumores más resistentes y de peor evolución que pueden requerir enfoques más agresivos o terapias alternativas.

3.3.3. Análisis del gen EGFR

El gen EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) se localiza en el cromosoma 7 (7p12), consta de 28 exones y codifica un RTK transmembrana que pertenece a la familia ERBB. Este receptor desempeña un papel crucial en la proliferación, supervivencia, migración y diferenciación celular [94]. En gliomas, el gen EGFR presenta alteraciones que conducen a la activación constitutiva de la TK sin necesidad de ligando, mayor proliferación y resistencia a terapias, y mal pronóstico en pacientes con glioblastomas.

La amplificación del gen EGFR es una de las alteraciones genómicas más frecuentes en gliomas de alto grado y ocurre debido a la inestabilidad genómica y selección clonal, que genera copias extras del gen ya sea en minicromosomas dobles¹, regiones en tándem² o reordenamientos cromosómicos y translocaciones. Esto conduce a una señalización oncogénica exacerbada y contribuye a la malignidad del glioma [95].

Los mecanismos moleculares que originan la amplificación del gen EGFR aumentan la probabilidad de errores durante la replicación del ADN, facilitando mutaciones estructurales que pueden conferir resistencia a los fármacos inhibidores de TK (TKI).

Durante la reparación del ADN, las copias amplificadas del gen EGFR pueden sufrir recombinación homóloga defectuosa entre secuencias repetidas, provocando la eliminación de los exones 2 al 7 del gen (801 pb), dando lugar a una proteína truncada que carece de parte del dominio extracelular (incluyendo la región de unión al ligando EGF/TGF- α) denominada variante III (EGFRvIII) pero conserva los dominios transmembrana (anclaje a la membrana celular) e intracelular (de actividad TK) [96].

La EGFRvIII no requiere unión a ligando para activarse, y dimeriza espontáneamente conduciendo a la autofosforilación de su dominio TK e hiperactivación de distintas vías de señalización. Además, no se internaliza y ni degrada tras la activación, perpetuando su actividad oncogénica [96].

Estas alteraciones en el gen EGFR se han descrito en gliomas de alto grado y se asocian a mayor agresividad y recurrencia temprana.

¹ Los minicromosomas dobles son pequeños fragmentos extracromosómicos que contienen múltiples copias de EGFR. No tienen centrómeros ni telómeros, por lo que se segregan de manera irregular durante la mitosis. Permiten una rápida amplificación génica sin integración en el genoma principal.

² Las Regiones de Amplificación en Tándem son regiones cromosómicas que contienen múltiples copias de EGFR en tándem. Ocurren cuando las copias amplificadas se reintegran en el cromosoma original (7p12) u otros cromosomas.

Por la metodología MLPA se determinó el número de copias del gen EGFR (estado de ploidía) para evaluar la presencia de amplificación mediante 11 sondas MLPA que hibridan en 11 exones del gen (exones 1 al 8, 13, 16 y 23). Para la interpretación de los resultados se consideró: i) un *ratio* promedio > 1,50 como indicativo de amplificación del gen EGFR, y ii) un *ratio* promedio > 15,0 como indicativo de amplificación alta del gen EGFR.

Para determinar la presencia de la EGFRvIII con esta técnica, se calculó el *ratio* promedio de las sondas MLPA en los exones 2 al 7 y se dividió por el *ratio* promedio de las sondas MLPA en los exones 1, 8, 13, 17 y 22 (*ratio*-EGFRvIII). Un *ratio*-EGFRvIII < 0,8 es indicativo de presencia de la EGFRvIII en el tumor [97].

La FIGURA 21 muestra las gráficas obtenidas a partir de esta técnica para dos glioblastomas IDHwt (H35 y H15).

En la TABLA 15 se resumen la frecuencia de la alteración por entidad tumoral, mientras que los resultados del número de copias del gen EGFR y presencia de la variante EGFRvIII de los 119 gliomas de la cohorte en estudio se detallan en la TABLA 16.

TABLA 15. Frecuencia de alteraciones en el gen EGFR en los 119 gliomas.

ENTIDAD	GRADO	N° CASOS alteración / Totales	
		amplificación	EGFRvIII
Astrocitoma difuso			
Astrocitoma difuso, IDHmut	2	1 / 9	1 / 9
Astrocitoma difuso, IDHwt	2	0 / 1	0 / 1
Astrocitoma anaplásico			
Astrocitoma anaplásico, IDHmut	3	3 / 6	2 / 6
Astrocitoma anaplásico, IDHwt	3	6 / 10	1 / 10
Glioblastoma			
Glioblastoma, IDHmut	4	2 / 7	1 / 7
Glioblastoma, IDHwt	4	47 / 78	11 / 47
Oligodendroglioma			
Oligodendroglioma, IDHmut y CD-1p/19q	2	0 / 5	0 / 5
Oligodendroglioma anaplásico			
Oligodendroglioma anaplásico, IDHmut y CD-1p/19q	3	0 / 3	0 / 3

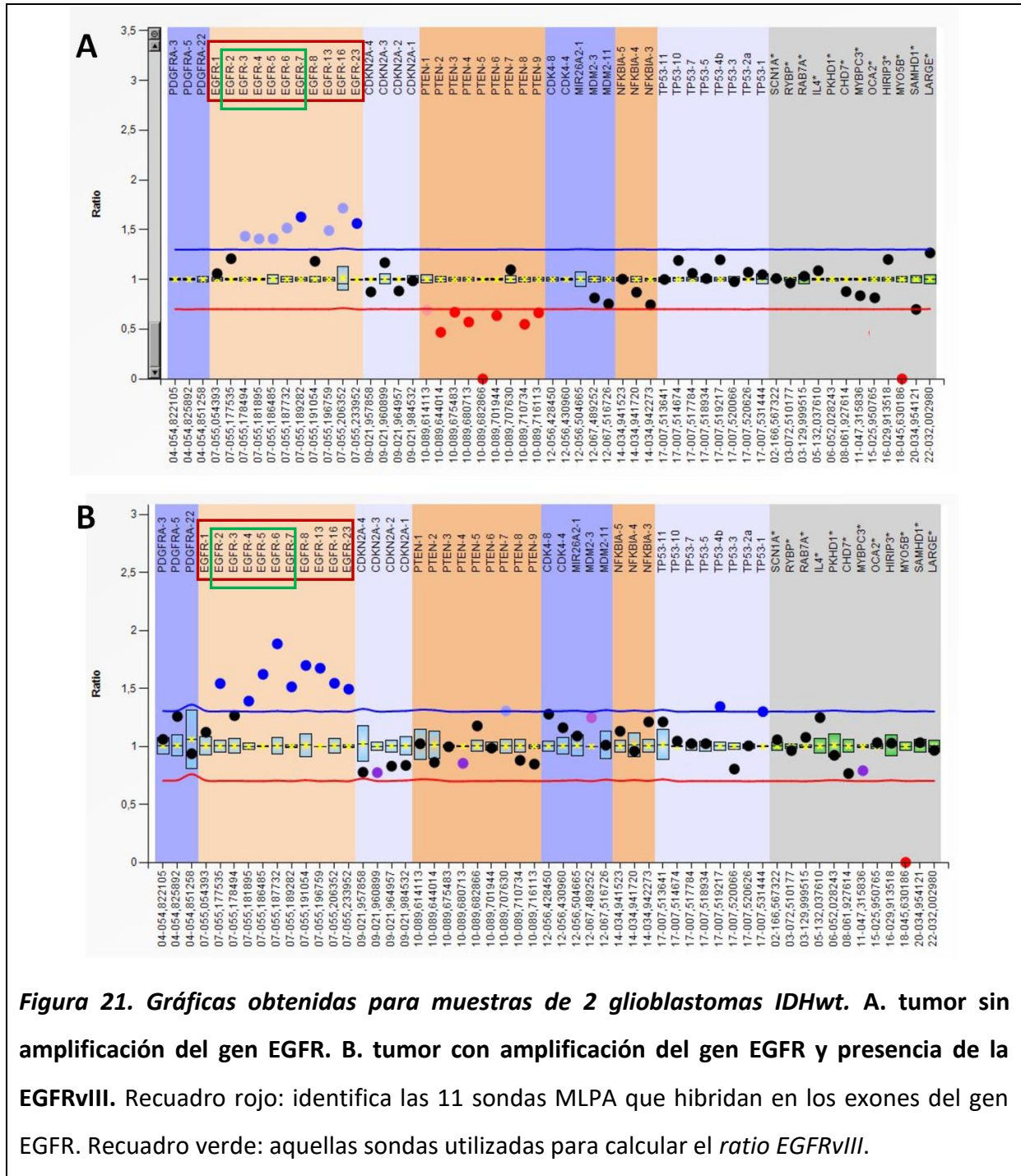


Figura 21. Gráficas obtenidas para muestras de 2 glioblastomas IDHwt. A. tumor sin amplificación del gen EGFR. B. tumor con amplificación del gen EGFR y presencia de la EGFRvIII. Recuadro rojo: identifica las 11 sondas MLPA que hibridan en los exones del gen EGFR. Recuadro verde: aquellas sondas utilizadas para calcular el *ratio EGFRvIII*.

TABLA 16. Presencia de amplificación del gen EGFR y de EGFRvIII en los 119 gliomas.

	O IDHmut y CD-1p19q					AD IDHmut										AD IDHwt						
	Glio 09	H29	G28	G27	Glio 05	Glio 15	Glio 06	H27	Glio 13	G19	H11	H39	H34	G35	Glio 21							
EGFR (7p11.2)	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	AMP (1,97)	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR							
EGFR viii	NO DET	NO DET	NO DET	NO DET	NO DET	NO DET	NO DET	NO DET	DET (0,71)	NO DET	NO DET	NO DET	NO DET	NO DET	NO DET							
	OA IDHmut y CD-1p19q			AA IDHmut							AA IDHwt											
	G20	H22	Glio 22	H20	H18	M7463	H06	H41	H24	Glio 19	H09	G25	H30	H45	M8597	H48	Glio 04	H21	H31			
EGFR (7p11.2)	NOR	NOR	NOR	AMP (11,56)	NOR	NOR	AMP (2,59)	NOR	AMP (6,85)	NOR	AMP (5,63)	NOR	AMP.AL (14,04)	AMP (1,72)	NOR	AMP (2,25)	AMP (7,46)	NOR	AMP (1,56)			
EGFR viii	NO DET	NO DET	NO DET	DET (0,74)	NO DET	NO DET	DET (0,73)	NO DET	NO DET	NO DET	NO DET	NO DET	DET (0,16)	NO DET	NO DET	NO DET	NO DET	NO DET	NO DET			
	M8961	Glio 08	M7464	H15	Glio 16	Glio 07	M7698	H35	Glio 20	M7816	G23	G30	H28	G33	G32	G45	Glio 02	Glio 10	G46			
	GBM IDHmut							GBM IDHwt														
EGFR (7p11.2)	NOR	NOR	NOR	NOR	AMPL (2,24)	NOR	AMP.AL (14,90)	NOR	NOR	NOR	NOR	AMP (2,22)	AMP.AL(21,60)	NOR	NOR	AMP (1,67)	NOR	AMP.AL (21,02)	NOR			
EGFR viii	NO DET	NO DET	NO DET	NO DET	DET (0,74)	NO DET	NO DET	NO DET	NO DET	NO DET	NO DET	NO DET	NO DET	NO DET	NO DET	NO DET	NO DET	NO DET	NO DET			
	Glio 18	H01	G22	G43	G44	Glio 01	H37	G49	H23	H47	M7465	G09	H10	H26	G37	H12	G36	H50	H02			
	GBM IDHwt																					
EGFR (7p11.2)	AMP.AL (41,14)	AMP (2,10)	AMP (7,38)	NOR	NOR	NOR	NOR	AMP (1,74)	NOR	AMP.AL (39,98)	AMP.AL (25,52)	AMP (2,15)	NOR	NOR	NOR	AMP.AL (27,59)	AMP (9,2)	AMP (2,13)	AMP. AL (33,17)			
EGFR viii	NO DET	NO DET	NO DET	NO DET	NO DET	NO DET	NO DET	NO DET	NO DET	DET (0,26)	NO DET	DET (0,74)	NO DET	NO DET	NO DET	NO DET	DET (0,25)	DET (0,78)	NO DET			
	G18	M7558	G40	H05	Glio 12	H08	G12	H19	G39	H32	G10	H13	G42	H03	H40	H16	H17	G31	H42			
	GBM IDHwt																					
EGFR (7p11.2)	NOR	AMP.AL (17,83)	NOR	AMP (2,27)	AMP (3,35)	AMP.AL (18,93)	NOR	AMP (7,74)	AMP.AL (13,88)	NOR	AMP (15,06)	AMP.AL (15,94)	NOR	AMP (2,31)	AMP (4,92)	NOR	AMP.AL (21,71)	AMP.AL (23,05)	AMP.AL (11,71)			
EGFR viii	NO DET	NO DET	NO DET	NO DET	NO DET	NO DET	NO DET	NO DET	NO DET	NO DET	DET (0,67)	NO DET	NO DET	DET (0,75)	NO DET	NO DET	NO DET	NO DET	DET (0,16)			

	M7545	G11	G48	H49	G47	Glio 03	Glio 14	G21	G26	H43	G29	G01	G16	G24	Glio 11	G02	H25	H38	G14
	GBM IDHwt																		
EGFR (7p11.2)	AMP (1,40)	NOR	AMP (1,62)	AMP (2,17)	AMP (1,88)	AMP (19,51)	NOR	NOR	AMP (1,64)	AMP (1,55)	NOR	AMP.AL (38,52)	NOR	AMP (1,73)	NOR	AMP (2,21)	AMP (6,50)	AMP (1,65)	NOR
EGFR vIII	NO DET	NO DET	NO DET	DET (0,75)	NO DET	NO DET	NO DET	NO DET	NO DET	NO DET	NO DET	DET (0,75)	NO DET	NO DET	NO DET	NO DET	DET (0,61)	NO DET	NO DET
	H36	H46	M8376	H44	G03	G15	G17	G05	G08										
	GBM IDHwt																		
EGFR (7p11.2)	AMP (9,45)	NOR	AMP (3,90)	AMP.AL (37,39)	AMP (2,08)	NOR	AMP.AL (26,09)	AMP (11,28)	AMP (1,88)										
EGFR vIII	NO DET	NO DET	NO DET	NO DET	NO DET	NO DET	NO DET	DET (0,13)	NO DET										

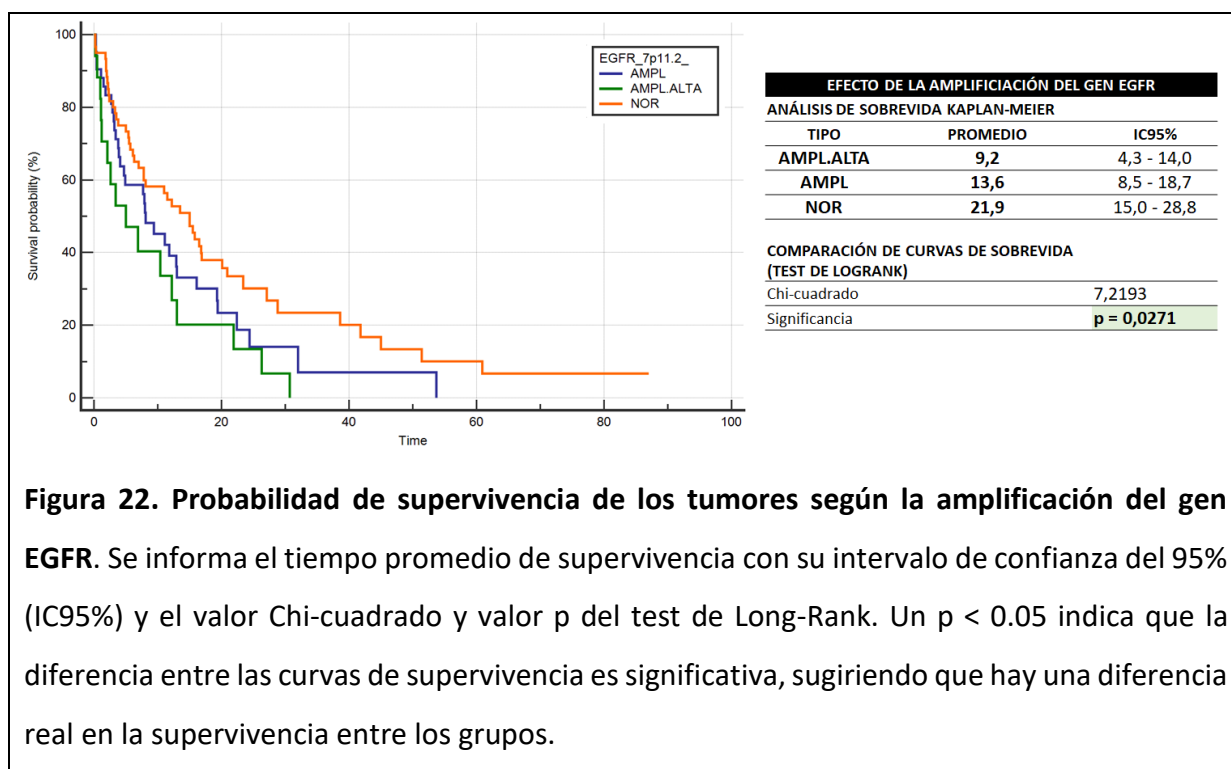
O: oligodendroglioma. OA: oligodendroglioma anaplásico. AD: astrocitoma difuso. AA: astrocitoma anaplásico. GBM: glioblastoma. mut: mutado. wt: salvaje o wild type. AMP: amplificación del gen EGFR ($1,50 > ratio$ promedio $< 15,0$). AMP.AL: amplificación alta del gen EGFR ($ratio$ promedio $> 15,0$).

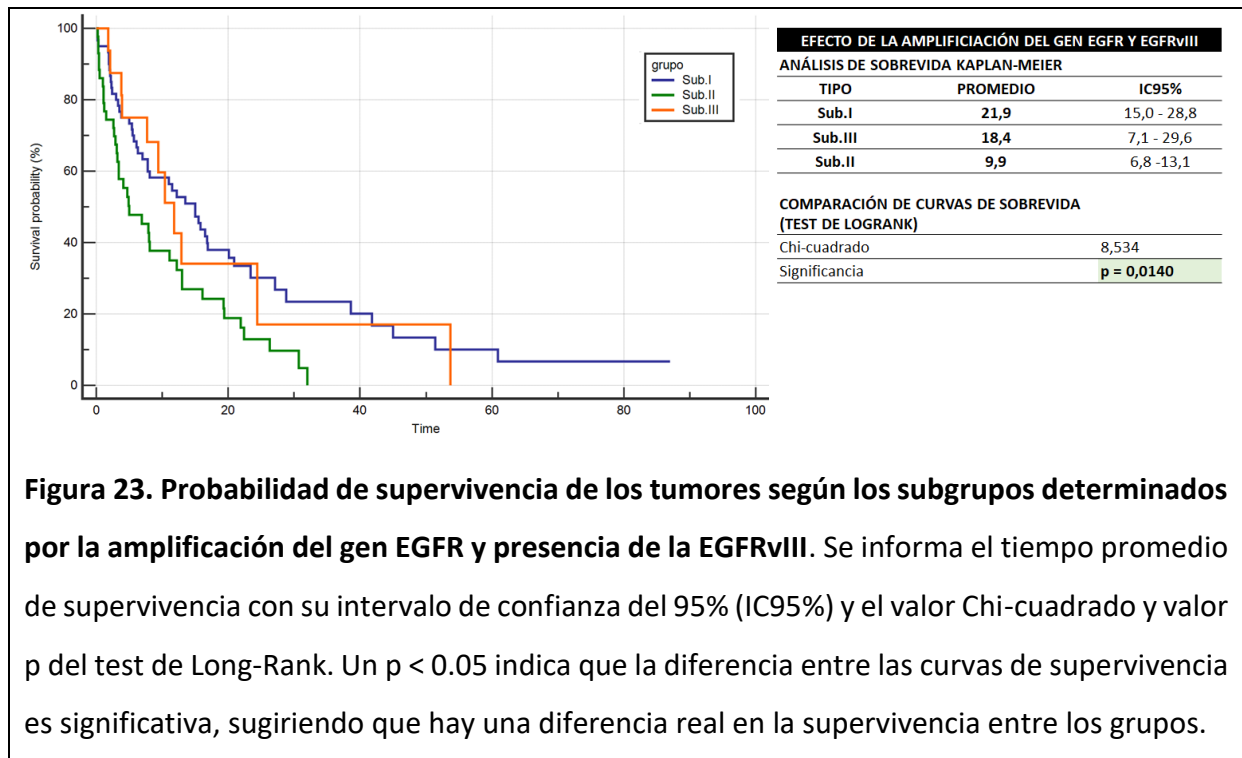
La curva de OS de los subgrupos tumorales definidos por la amplificación del gen EGFR (FIGURA 22) permite observar un peor pronóstico para aquellos tumores con amplificación del gen EGFR (OS-EGFR_{AMP.AL}: 9,2 meses y OS-EGFR_{AMP}: 13,6 meses) en relación con aquellos gliomas que no presentan esta alteración (OS-EGFR_{NOR}: 21,9 meses).

Es importante distinguir que los gliomas con amplificación del gen EGFR pueden presentar o no la EGFRvIII. Considerando ambas alteraciones, se pueden definir 3 subgrupos tumorales:

- **subgrupo I:** tumores sin alteraciones en el gen EGFR.
- **subgrupo II:** tumores con amplificación del gen EGFR y ausencia de la EGFRvIII.
- **subgrupo III:** tumores con amplificación del gen EGFR y presencia de la EGFRvIII.

La curva de OS de estos subgrupos tumorales (FIGURA 23) permite determinar un peor pronóstico para el subgrupo II (OS-II: 9,2 meses) y una OS no estadísticamente significativos para los subgrupos I y III.





Estos resultados indicarían que la amplificación del gen EGFR es un factor pronóstico independiente para los tumores gliales, mientras que la presencia de la EGFRvIII no lo sería.

3.3.4. Análisis del gen CDKN2A/B

Los genes CDKN2A/B (*Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A/B*) son genes supresores de tumores ubicados en el cromosoma 9 (9p21.3). Esta región es frecuentemente alterada en varios tipos de cáncer, incluidos los gliomas [98]. El gen CDKN2A codifica dos proteínas: i) p16INK4a que inhibe las quinasas dependientes de ciclina (CDK4/6), impidiendo la progresión del ciclo celular (bloqueo en la transición G1→S) y p14ARF que estabiliza p53 al inhibir MDM2, promoviendo la apoptosis o la senescencia celular [99]. El gen CDKN2B codifica la proteína p15INK4b, inhibidor de CDK4/6, con funciones similares a p16INK4a en la regulación del ciclo celular [99].

La delección del gen CDKN2A es una de las alteraciones genómicas más frecuentes en gliomas astrocitarios de alto grado y ocurre debido a la inestabilidad genómica, común en cánceres agresivos. La región 9p21.3 es particularmente susceptible a pérdidas genómicas debido a su estructura frágil y a la presencia de repeticiones génicas y secuencias propensas a rupturas. Por la metodología MLPA se determinó el número de copias de los genes CDKN2A/B (estado de ploidía) para evaluar la presencia de delección mediante 5 sondas MLPA que hibridan en 3

exones del gen CDKN2A (exones 1 al 3) y 2 sondas MLPA que lo hacen en 2 exones del gen CDKN2B (exones 1 y 2) cuando se usa la MLPA Probemix P088. El estado de ploidía del gen CDKN2A también puede verificarse con la MLPA Probemix P105, la cual contiene 4 sondas MLPA que hibridan con los exones 1 al 4 del gen. Para la interpretación de los resultados del estado de ploidía de los genes CDKN2A/B se consideró:

- i) un *ratio* promedio < 0,35 como indicativo de delección homocigota, y
- ii) un *ratio* promedio de 0,36 a 0,70 como indicativo de delección heterocigota.

La FIGURA 24 muestra las gráficas obtenidas a partir de esta técnica para dos glioblastomas IDHwt (G21 y G29).

En la TABLA 17 se resumen la frecuencia de la alteración por entidad tumoral, mientras que los resultados del número de copias para los genes CDKN2A/B de los 119 gliomas de la cohorte en estudio se detallan en la TABLA 18.

TABLA 17. Frecuencia de alteraciones en los genes CDKN2A/B en los 119 gliomas.		
ENTIDAD	GRADO	N° CASOS Delección / Totales
Astrocitoma difuso		
Astrocitoma difuso, IDHmut	2	0 / 9
Astrocitoma difuso, IDHwt	2	0 / 1
Astrocitoma anaplásico		
Astrocitoma anaplásico, IDHmut	3	3 / 6
Astrocitoma anaplásico, IDHwt	3	6 / 10
Glioblastoma		
Glioblastoma, IDHmut	4	3 / 7
Glioblastoma, IDHwt	4	42 / 78
Oligodendroglioma		
Oligodendroglioma, IDHmut y CD-1p/19q	2	2 / 5
Oligodendroglioma anaplásico		
Oligodendroglioma anaplásico, IDHmut y CD-1p/19q	3	1 / 3

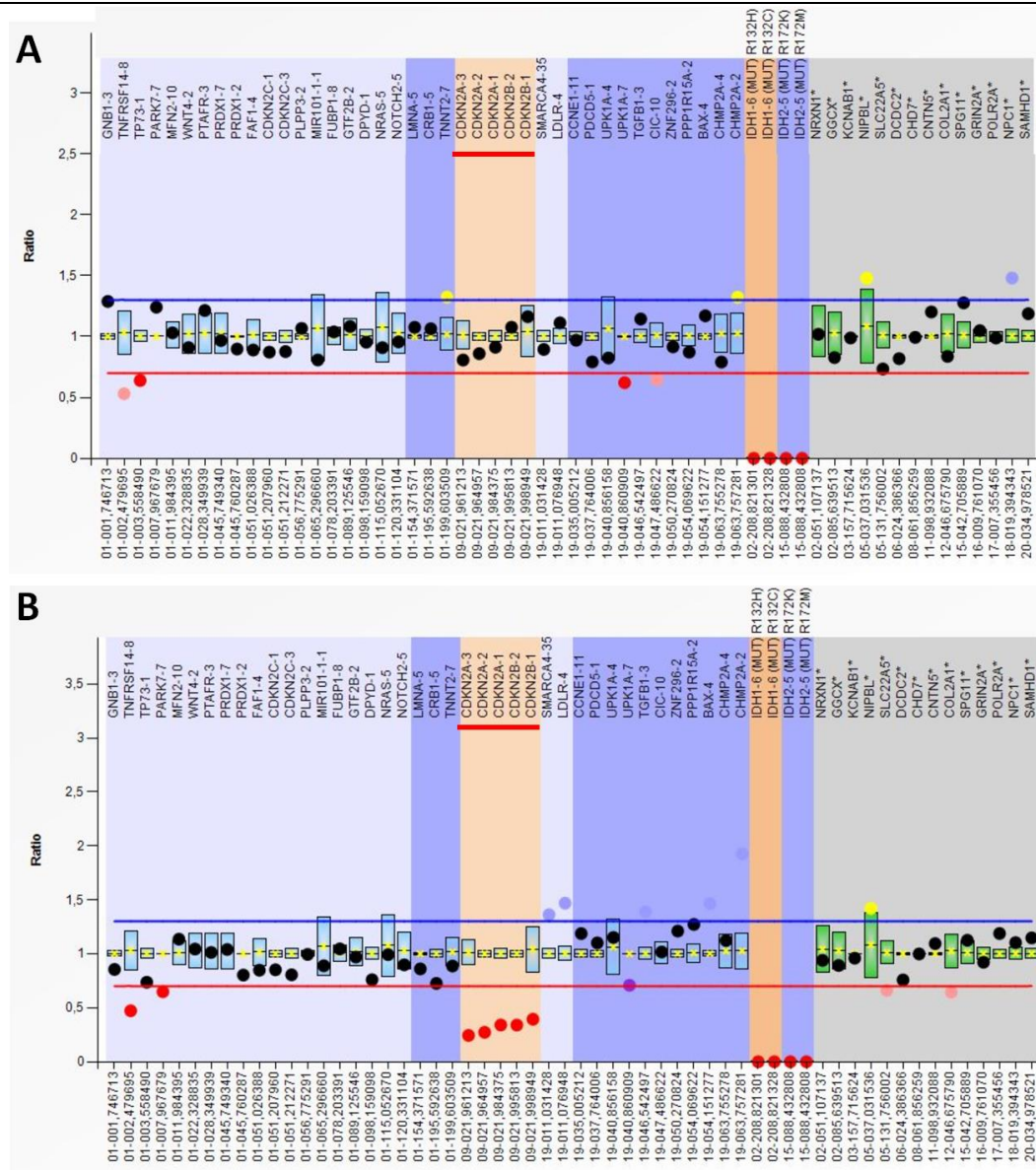


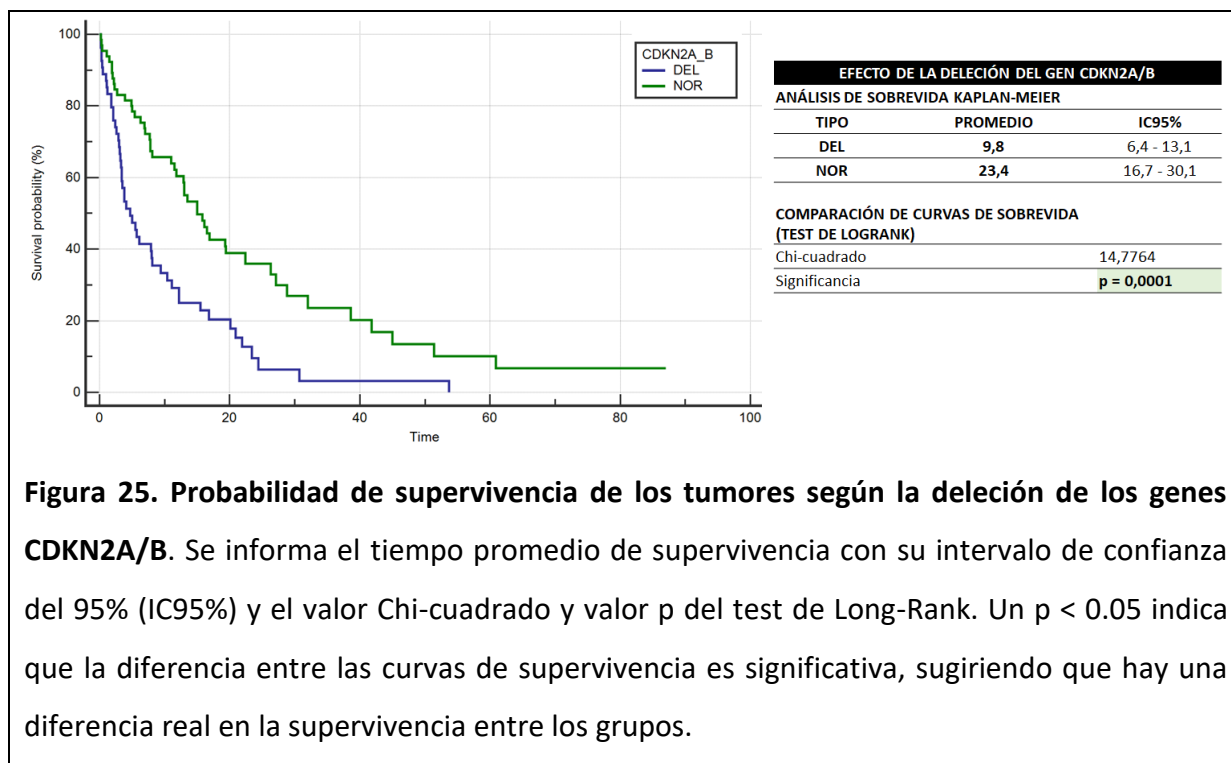
Figura 24. Gráficas obtenidas para muestras de 2 glioblastomas *IDHwt*. **A.** tumor sin delección en los genes *CDKN2A/B*. **B.** tumor con delección en los genes *CDKN2A/B*. La línea roja identifica las sondas MLPA que hibridan en los exones de los genes *CDKN2A/B*.

TABLA 18. Presencia de delección de los genes CDKN2A/B en los 119 gliomas.

	O IDHmut y CD-1p19q					AD IDHmut										AD IDHwt								
	Glio 09	H29	G28	G27	Glio 05	Glio 15	Glio 06	H27	Glio 13	G19	H11	H39	H34	G35	Glio 21									
CDKN2A/2B (9p21.3)	NOR	NOR	DEL (0,60)	NOR	DEL (0,10)	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR								
	OA IDHmut y CD-1p19q			AA IDHmut						AA IDHwt														
	G20	H22	Glio 22	H20	H18	M7463	H06	H41	H24	Glio 19	H09	G25	H30	H45	M8597	H48	Glio 04	H21	H31					
CDKN2A/2B (9p21.3)	NOR	DEL (0,59)	NOR	DEL (0,52)	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	DEL (0,31)	DEL (0,55)	DEL (0,40)	DEL (0,43)	DEL (0,51)	NOR					
	M8961	Glio 08	M7464	H15	Glio 16	Glio 07	M7698	H35	Glio 20	M7816	G23	G30	H28	G33	G32	G45	Glio 02	Glio 10	G46					
	GBM IDHmut							GBM IDHwt																
CDKN2A/2B (9p21.3)	NOR	NOR	DEL (0,31)	DEL (0,13)	NOR	NOR	DEL (0,12)	NOR	DEL (0,17)	NOR	DEL (0,37)	NOR	NOR	DEL (0,52)	NOR	DEL (0,32)	DEL (0,64)	DEL (0,45)	NOR					
	Glio 18	H01	G22	G43	G44	Glio 01	H37	G49	H23	H47	M7465	G09	H10	H26	G37	H12	G36	H50	H02					
	GBM IDHwt																							
CDKN2A/2B (9p21.3)	DEL (0,28)	NOR	DEL (0,50)	NOR	DEL (0,44)	DEL (0,50)	DEL (0,64)	NOR	NOR	DEL (0,05)	DEL (0,52)	NOR	NOR	NOR	NOR	DEL (0,24)	DEL (0,25)	DEL (0,57)	NOR					
	G18	M7558	G40	H05	Glio 12	H08	G12	H19	G39	H32	G10	H13	G42	H03	H40	H16	H17	G31	H42					
	GBM IDHwt																							
CDKN2A/2B (9p21.3)	DEL (0,35)	DEL (0,71)	NOR	NOR	NOR	DEL (0,39)	NOR	DEL (0,00)	NOR	DEL (0,57)	NOR	NOR	NOR	DEL (0,54)	NOR	DEL (0,51)	DEL (0,10)	NOR	DEL (0,05)					
	M7545	G11	G48	H49	G47	Glio 03	Glio 14	G21	G26	H43	G29	G01	G16	G24	Glio 11	G02	H25	H38	G14					
	GBM IDHwt																							
CDKN2A/2B (9p21.3)	NOR	DEL (0,15)	DEL (0,38)	DEL (0,31)	NOR	DEL (0,20)	NOR	DEL (0,30)	DEL (0,35)	DEL (0,58)	NOR	DEL (0,53)	NOR	DEL (0,09)	NOR	DEL (0,23)	NOR	DEL (0,47)	DEL (0,09)					
	H36	H46	M8376	H44	G03	G15	G17	G05	G08															
	GBM IDH wt																							
CDKN2A/2B (9p21.3)	DEL (0,16)	NOR	NOR	DEL (0,00)	NOR	NOR	DEL (0,19)	DEL (0,5)	DEL (0,25)															

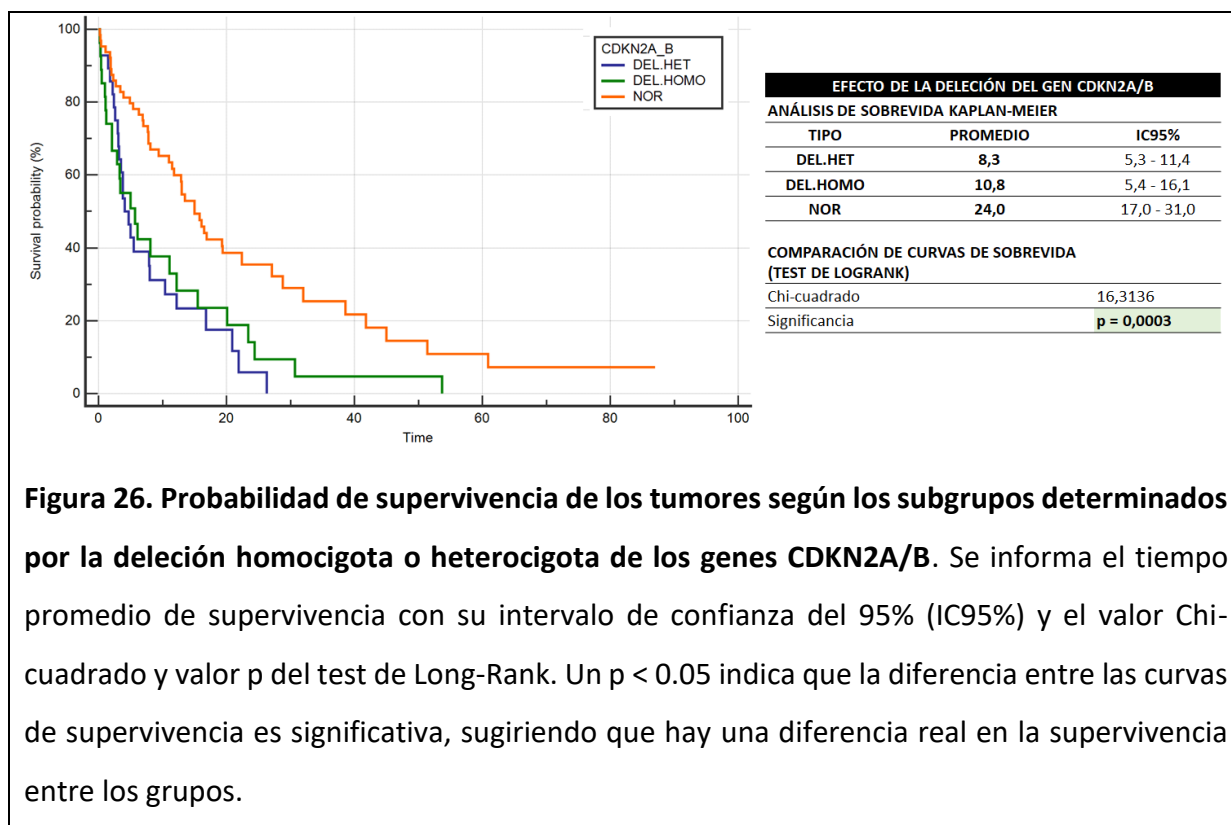
O: oligodendroglioma. OA: oligodendroglioma anaplásico. AD: astrocitoma difuso. AA: astrocitoma anaplásico. GBM: glioblastoma. mut: mutado. wt: salvaje o wild type.

La curva de OS de los subgrupos tumorales definidos por la delección de los genes CDKN2A/B (FIGURA 25) permite observar un peor pronóstico para aquellos tumores con delección de los genes CDKN2A/B (OS-CDKN2A/B_{DEL}: 9,8 meses) en relación con aquellos gliomas que no presentan esta alteración (OS-CDKN2A/B_{NOR}: 23,4 meses).



Cuando se considera el estado de ploidía de los genes CDKN2A/B (FIGURA 26), los subgrupos tumorales con delección homocigota o heterocigota no presentan una OS estadísticamente significativa entre sí (OS-CDKN2A/B_{HET}: 8,3 meses y OS-CDKN2A/B_{HOMO}: 10,8 meses) en comparación a la ausencia de esta alteración (OS-CDKN2A/B_{NOR}: 24,0 meses).

Estos resultados indicarían que la delección de los genes CDKN2A/B es un factor pronóstico independiente para los tumores gliales, mientras que la distinción entre el estado de ploidía no aportaría información pronóstica.



3.3.5. Análisis del gen PDGFRA

El gen PDGFRA (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor Alpha*) se localiza en el cromosoma 4 (4q12), consta de 21 exones y codifica un RTK implicado en la proliferación, supervivencia y migración celular [100]. Las alteraciones del gen PDGFRA se han descrito en gliomas de estirpe astrocitaria, siendo las de mayor frecuencia la amplificación genómica lo cual conduce a la sobreexpresión del receptor y una hiperactivación de vías de señalización protumorales (PI3K, RAS). También se han reportado delecciones intragénicas que genera isoformas truncadas con activación constitutiva [101].

La metodología MLPA puede utilizarse para evaluar el estado de ploidía del gen PDGFRA. En la Probemix P105 se incluyen 3 sondas MLPA que hibridan en los exones 3, 5 y 22 del gen. Para la interpretación de los resultados del estado de ploidía del gen PDGFRA se consideró:

- i) un *ratio* promedio $< 0,75$ como indicativo de delección y
- ii) un *ratio* promedio $> 1,25$ como indicativo de amplificación génica.

En la TABLA 19 se resumen la frecuencia de la alteración por entidad tumoral mientras que los resultados del número de copias para los genes PDGFRA de los 119 gliomas de la cohorte en estudio se detallan en la TABLA 20.

TABLA 19. Frecuencia de alteraciones en el gen PDGFRA en los 119 gliomas.

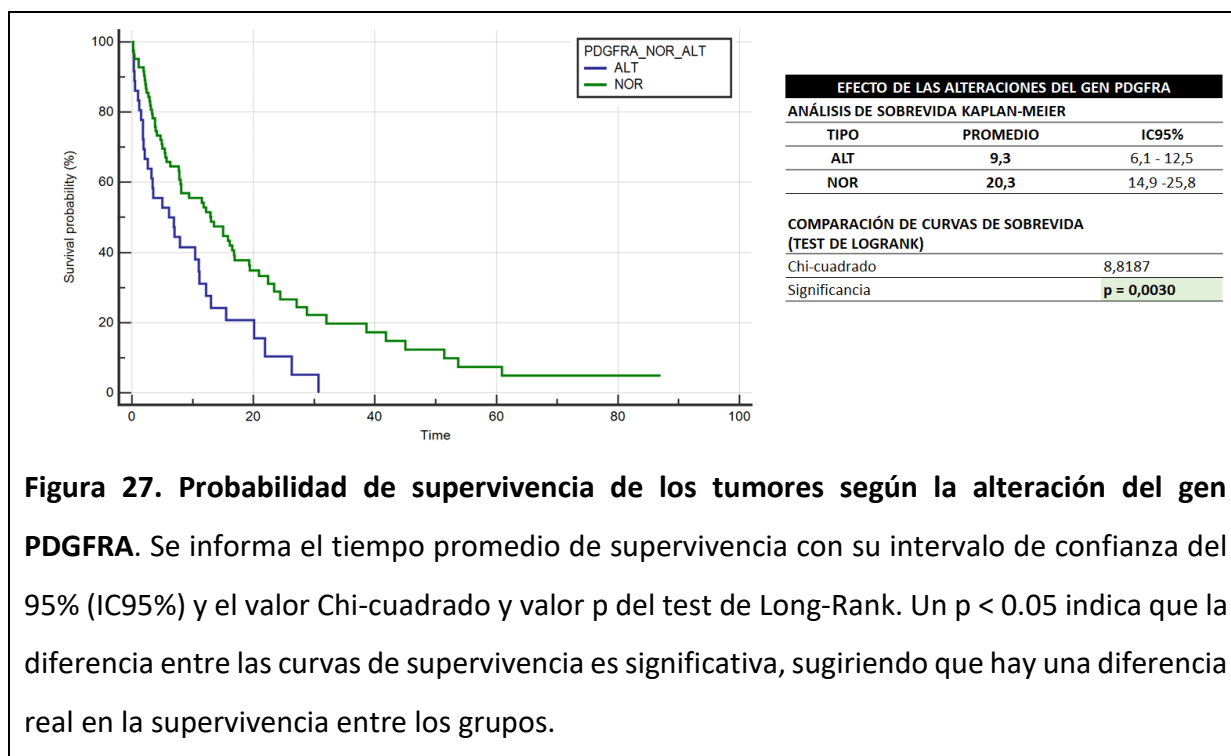
ENTIDAD	GRADO	Nº CASOS	
		Delección / Totales	Amplificación / Totales
Astrocitoma difuso			
Astrocitoma difuso, IDHmut	2	0 / 9	0 / 9
Astrocitoma difuso, IDHwt	2	0 / 1	0 / 1
Astrocitoma anaplásico			
Astrocitoma anaplásico, IDHmut	3	0 / 6	0 / 6
Astrocitoma anaplásico, IDHwt	3	2 / 10	1 / 10
Glioblastoma			
Glioblastoma, IDHmut	4	1 / 7	2 / 7
Glioblastoma, IDHwt	4	18 / 78	10 / 78
Oligodendroglioma			
Oligodendroglioma, IDHmut y CD-1p/19q	2	0 / 5	0 / 5
Oligodendroglioma anaplásico			
Oligodendroglioma anaplásico, IDHmut y CD-1p/19q	3	0 / 3	1 / 3

La curva de OS de los subgrupos tumorales definidos cuando se consideran por separado la delección o la amplificación del gen PDGFRA (FIGURA 27) permite observar un mejor pronóstico para aquellos tumores sin alteraciones en el gen (OS-PDGFRA_{NOR}: 20,3 meses) en relación con aquellos gliomas que presentan delección (OS-PDGFRA_{DEL}: 9,3 meses) o amplificación (OS-PDGFRA_{AMPL}: 6,6 meses).

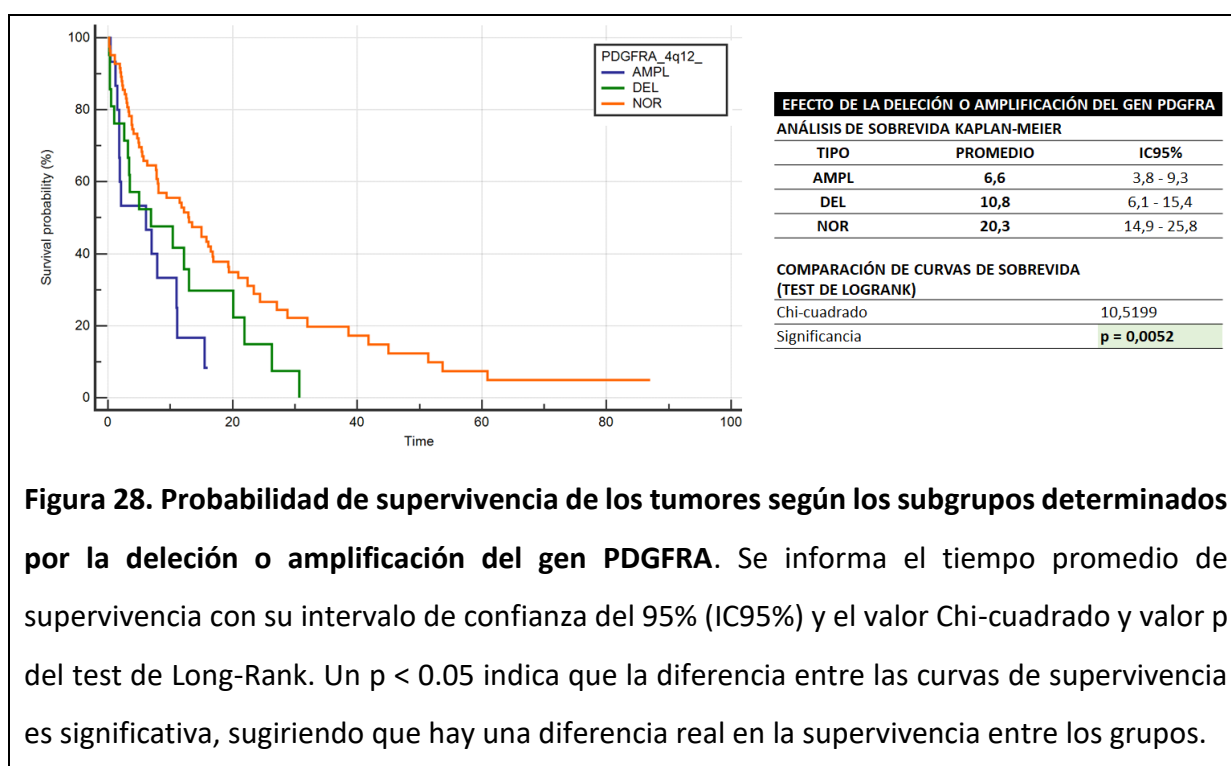
TABLA 20. Presencia de delección del gen PDGFRA en los 119 gliomas.

	O IDHmut y CD-1p19q					AD IDHmut									AD IDHwt									
	Glio 09	H29	G28	G27	Glio 05	Glio 15	Glio 06	H27	Glio 13	G19	H11	H39	H34	G35	Glio 21									
PDGFRA (4q12)	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR								
	OA IDHmut y CD-1p19q			AA IDHmut						AA IDHwt														
	G20	H22	Glio 22	H20	H18	M7463	H06	H41	H24	Glio 19	H09	G25	H30	H45	M8597	H48	Glio 04	H21	H31					
PDGFRA (4q12)	NOR	AMPL (3,54)	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	DEL (0,67)	NOR	AMPL (19,18)	NOR	NOR	DEL (0,00)	NOR	NOR					
	M8961	Glio 08	M7464	H15	Glio 16	Glio 07	M7698	H35	Glio 20	M7816	G23	G30	H28	G33	G32	G45	Glio 02	Glio 10	G46					
	GBM IDHmut							GBM IDHwt																
PDGFRA (4q12))	NOR	NOR	NOR	AMPL (15,73)	AMPL (1,64)	DEL (0,50)	NOR	AMPL (5,04)	NOR	NOR	NOR	NOR	DEL (0,50)	NOR	NOR	NOR	NOR	DEL (0,33)	NOR					
	Glio 18	H01	G22	G43	G44	Glio 01	H37	G49	H23	H47	M7465	G09	H10	H26	G37	H12	G36	H50	H02					
	GBM IDHwt																							
PDGFRA (4q12)	DEL (0,00)	NOR	NOR	NOR	AMPL (2,54)	DEL (0,41)	NOR	NOR	NOR	AMPL (3,17)	DEL (0,00)	NOR	NOR	NOR	NOR	DEL (0,00)	NOR	NOR	NOR					
	G18	M7558	G40	H05	Glio 12	H08	G12	H19	G39	H32	G10	H13	G42	H03	H40	H16	H17	G31	H42					
	GBM IDHwt																							
PDGFRA (4q12)	DEL (0,35)	DEL (0,67)	NOR	NOR	AMPL (2,36)	DEL (0,00)	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	DEL (0,00)	NOR	AMPL (13,64)	NOR	NOR	DEL (0,62)	DEL (0,00)	NOR					
	M7545	G11	G48	H49	G47	Glio 03	Glio 14	G21	G26	H43	G29	G01	G16	G24	Glio 11	G02	H25	H38	G14					
	GBM IDHwt																							
PDGFRA (4q12)	NOR	NOR	DEL (0,58)	NOR	DEL (0,37)	DEL (0,00)	AMPL (9,32)	NOR	AMPL (16,27)	NOR	NOR	DEL (0,58)	AMPL (8,82)	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR					
	H36	H46	M8376	H44	G03	G15	G17	G05	G08															
	GBM IDH wt																							
PDGFRA (4q12)	AMPL (1,53)	NOR	NOR	AMPL (2,50)	NOR	DEL (0,51)	DEL (0,00)	NOR	NOR															

O: oligodendroglioma. OA: oligodendroglioma anaplásico. AD: astrocitoma difuso. AA: astrocitoma anaplásico. GBM: glioblastoma. mut: mutado. wt: salvaje o wild type.



Cuando se considera el tipo de alteración génica (FIGURA 28), los subgrupos tumorales con delección o amplificación no presentan una OS estadísticamente significativa entre sí (OS-PDGFR_{DEL}: 10,8 meses y OS-PDGFR_{AMPL}: 6,6 meses) en comparación a la ausencia de esta alteración (OS-PDGFR_{NOR}: 20,3 meses).



Estos resultados indicarían que una alteración en el gen PDGFRA es un factor pronóstico independiente para los tumores gliales, mientras que la distinción entre el tipo de alteración no aportaría información pronóstica.

3.3.6. Análisis de los genes CDK4 y MDM2, y el MicroRNA 26a-2 (MIR26A2)

Estos tres genes desempeñan roles críticos en la patogénesis de los gliomas, especialmente en los glioblastomas. Se localizan en el cromosoma 12 (12q13-q15) y frecuentemente se encuentran co-amplificados en estas neoplasias.

El gen CDK4 (*Cyclin-Dependent Kinase 4*) codifica una proteína quinasa que regula el ciclo celular (transición G1→S) al fosforilar la proteína pRB y liberar factores de transcripción promotores de proliferación [102].

El gen MDM2 (*Mouse Double Minute 2 Homolog*) codifica para la E3 ubiquitina ligasa que produce la degradación de p53 llevando a la célula a escapar de los mecanismos de apoptosis y senescencia [102].

Por otro lado, el MicroRNA 26a-2 (MIR26A2) se encuentra en el intrón 12 del gen CTDSP2, localizado en la región 12q14.1 (misma región que CDK4 y MDM2), y codifica una fosfatasa implicada en la regulación del ciclo celular. MIR26A2 es transcrito junto con el gen CTDSP2 (como parte de su ARN primario, o pri-miRNA) y luego procesado para generar el microRNA maduro. MIR26A2 regula negativamente al gen PTEN, entre otros, y activa la vía PI3K/AKT/mTOR. [103]

La metodología MLPA permite evaluar el estado de ploidía de estos genes. En la Probemix P105 se incluyen sondas MLPA que hibridan en los exones 4 y 8 del gen CDK4, exones 2 y 10 del gen MDM2 y del exón 1 del gen MIR26A2. Para la interpretación de los resultados del estado de ploidía del gen PDGFRA se consideró:

- i) un *ratio* promedio < 0,75 como indicativo de delección y
- ii) un *ratio* promedio > 1,25 como indicativo de amplificación génica.

En la TABLA 21 se resumen la frecuencia de la alteración por entidad tumoral mientras que los resultados del número de copias para los genes CDK4, MDM2 y MIR26A2 de los 119 gliomas de la cohorte en estudio se detallan en la TABLA 22.

TABLA 21. Frecuencia de alteraciones en los genes CDK4, MDM2 y MIR26A2 en los 119 gliomas.

ENTIDAD	GRADO	N° CASOS		
		CDK4	MDM2	MIR26A2
Astrocitoma difuso				
Astrocitoma difuso, IDHmut	2	0 / 9	2 / 9	1 / 9
Astrocitoma difuso, IDHwt	2	0 / 1	0 / 1	0 / 1
Astrocitoma anaplásico				
Astrocitoma anaplásico, IDHmut	3	1 / 6	1 / 6	1 / 6
Astrocitoma anaplásico, IDHwt	3	1 / 10	2 / 10	6 / 10
Glioblastoma				
Glioblastoma, IDHmut	4	2 / 7	1 / 7	2 / 7
Glioblastoma, IDHwt	4	32 / 78	27 / 78	42 / 78
Oligodendroglioma				
Oligodendroglioma, IDHmut y CD-1p/19q	2	1 / 5	0 / 5	2 / 5
Oligodendroglioma anaplásico				
Oligodendroglioma anaplásico, IDHmut y CD-1p/19q	3	0 / 3	0 / 3	1 / 3

En general, las deleciones completas de estos genes son raras en gliomas, pero pueden ocurrir en contextos específicos, especialmente en subtipos moleculares particulares. Los resultados obtenidos revelan deleciones frecuentes, al menos de los exones estudiados, de estos genes no indicando esto deleción completa del gen. Se ha descrito deleciones somáticas parciales en el gen CDK4 en gliomas con inestabilidad cromosómica, por ejemplo, en determinados glioblastomas con amplificaciones complejas. Sin embargo, la pérdida del gen CDK4 no es un biomarcador establecido en gliomas, a diferencia de su amplificación que es más relevante. Con respecto a MIR26A2 (12q14.1), su pérdida no sería ventajosa para el tumor, pero podría asociarse a mayor sensibilidad a terapias (al perder mecanismos de resistencia mediados por miR-26a). Finalmente, dado que el gen MDM2 es crítico para la inactivación de p53 (su pérdida reactivaría la apoptosis), una deleción de este gen podría no ser perjudicial, ya que p53 ya está inactivado, pudiendo teóricamente mejorar la respuesta a radioterapia.

TABLA 22. Presencia de alteraciones de los genes CDK4, MDM2 y MIR26A2 en los 119 gliomas.

	O IDHmut y CD-1p19q					AD IDHmut									AD IDHwt				
	Glio 09	H29	G28	G27	Glio 05	Glio 15	Glio 06	H27	Glio 13	G19	H11	H39	H34	G35	Glio 21				
CDK4 (12q14.1)	AMPL (2,46)	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR				
MIR26A2	AMPL (2,30)	NOR	NOR	AMPL (1,68)	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	DEL (0,47)	NOR	NOR				
MDM2 (12q15)	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	DEL (0,65)	DEL (0,52)	NOR	NOR				
	OA IDHmut y CD-1p19q			AA IDHmut						AA IDHwt									
	G20	H22	Glio 22	H20	H18	M7463	H06	H41	H24	Glio 19	H09	G25	H30	H45	M8597	H48	Glio 04	H21	H31
CDK4 (12q14.1)	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	AMPL (17,88)	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	DEL (0,00)	NOR	NOR
MIR26A2	NOR	NOR	DEL (0,57)	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	AMPL (14,33)	DEL (0,28)	NOR	DEL (0,00)	DEL (0,00)	NOR	NOR	AMPL (1,79)	DEL (0,00)	NOR	DEL (0,00)
MDM2 (12q15)	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	AMPL (10,0)	NOR	NOR	AMPL (1,48)	NOR	NOR	NOR	NOR	DEL (0,00)	NOR	NOR
	M8961	Glio 08	M7464	H15	Glio 16	Glio 07	M7698	H35	Glio 20	M7816	G23	G30	H28	G33	G32	G45	Glio 02	Glio 10	G46
	GBM IDHmut							GBM IDHwt											
CDK4 (12q14.1)	NOR	NOR	NOR	NOR	AMPL (12,65)	AMPL (4,32)	NOR	AMPL (19,09)	NOR	AMPL (1,97)	NOR	AMPL (17,86)	NOR	NOR	NOR	DEL (0,56)	NOR	AMPL (10,48)	DEL (0,47)
MIR26A2	NOR	NOR	NOR	NOR	AMPL (14,76)	NOR	AMPL (1,5)	AMPL (23,22)	NOR	NOR	AMPL (1,39)	DEL (0,00)	DEL (0,00)	NOR	NOR	DEL (0,00)	NOR	AMPL (5,85)	DEL (0,00)
MDM2 (12q15)	NOR	NOR	NOR	NOR	NOE	DEL (0,44)	NOR	NOR	NOR	AMPL (1,55)	NOR	AMPL (19,61)	DEL (0,00)	NOR	NOR	DEL (0,00)	NOR	DEL (0,00)	DEL (0,00)
	Glio 18	H01	G22	G43	G44	Glio 01	H37	G49	H23	H47	M7465	G09	H10	H26	G37	H12	G36	H50	H02
	GBM IDHwt																		
CDK4 (12q14.1)	AMPL (3,31)	DEL (0,50)	NOR	NOR	DEL (0,54)	AMPL (3,64)	NOR	DEL (0,52)	AMPL (4,52)	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	DEL (0,50)	NOR	NOR	DEL (0,50)
MIR26A2	DEL (0,00)	DEL (0,37)	DEL (0,00)	NOR	DEL (0,00)	NOR	NOR	DEL (0,00)	AMPL (4,80)	DEL (0,00)	DEL (0,00)	AMPL (1,55)	NOR	NOR	NOR	DEL (0,00)	NOR	AMPL (1,53)	DEL (0,00)
MDM2 (12q15)	DEL (0,51)	NOR	NOR	NOR	DEL (0,30)	AMPL (11,50)	NOR	DEL (0,35)	NOR	DEL (0,00)	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	DEL (0,00)	NOR	NOR	AMPL (5,41)

	G18	M7558	G40	H05	Glio 12	H08	G12	H19	G39	H32	G10	H13	G42	H03	H40	H16	H17	G31	H42
	GBM IDHwt																		
CDK4 (12q14.1)	DEL (0,48)	NOR	AMPL (5,2)	AMPL (12,89)	AMPL (6,04)	DEL (0,50)	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	DEL (0,00)	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	AMPL (23,20)	NOR
MIR26A2	NOR	DEL (0,00)	AMPL (4,3)	AMPL (10,48)	AMPL (4,98)	DEL (0,00)	DEL (0,00)	NOR	NOR	NOR	NOR	DEL (0,00)	NOR	DEL (0,56)	DEL (0,00)	NOR	DEL (0,00)	AMPL (7,68)	NOR
MDM2 (12q15)	NOR	AMPL (1,70)	DEL (0,30)	AMPL (13,55)	NOR	DEL (0,00)	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	DEL (0,00)	NOR	NOR	NOR	NOR	DEL (0,00)	AMPL (22,80)	NOR
	M7545	G11	G48	H49	G47	Glio 03	Glio 14	G21	G26	H43	G29	G01	G16	G24	Glio 11	G02	H25	H38	G14
	GBM IDHwt																		
CDK4 (12q14.1)	AMPL (7,26)	NOR	DEL (0,54)	NOR	AMPL (6,87)	DEL (0,50)	AMPL (6,84)	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	DEL (0,32)	AMPL (1,43)	AMPL (16,03)	NOR	NOR	NOR	NOR
MIR26A2	AMPL (2,61)	NOR	NOR	NOR	AMPL (6,84)	DEL (0,00)	AMPL (5,25)	NOR	AMPL (1,80)	NOR	NOR	NOR	DEL (0,00)	AMPL (1,43)	NOR	NOR	DEL (0,00)	NOR	NOR
MDM2 (12q15)	NOR	NOR	DEL (0,31)	NOR	DEL (0,00)	DEL (0,00)	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	AMPL (7,21)	NOR	NOR	NOR	NOR
	H36	H46	M8376	H44	G03	G15	G17	G05	G08										
	GBM IDHwt																		
CDK4 (12q14.1)	NOR	NOR	AMPL (1,85)	NOR	NOR	DEL (0,39)	DEL (0,50)	NOR	NOR										
MIR26A2	NOR	NOR	DEL (0,50)	DEL (0,00)	NOR	DEL (0,00)	DEL (0,00)	NOR	NOR										
MDM2 (12q15)	NOR	NOR	AMPL (1,55)	DEL (0,00)	NOR	NOR	DEL (0,41)	NOR	NOR										

O: oligodendroglioma. OA: oligodendroglioma anaplásico. AD: astrocitoma difuso. AA: astrocitoma anaplásico. GBM: glioblastoma. mut: mutado. wt: *wild type*.

Cuando se analizan las curvas de OS para los subgrupos tumorales considerando únicamente la amplificación génica, no se observa una correlación estadísticamente significativa ($p > 0,005$ en el test de Logrank) con respecto a aquellos tumores con estos genes no amplificados (datos no mostrados). Sin embargo, la curva de OS de los subgrupos tumorales definidos cuando se consideran las alteraciones (amplificación o delección) de los genes *CDK4*, *MDM2* y *MIR26A2* por separado (FIGURA 29) permite observar un mejor pronóstico para aquellos tumores sin alteraciones en estos genes (OS-*CDK4*_{NOR}: 19,6 meses; OS-*MDM2*_{NOR}: 19,9 meses; OS-*MIR26A2*_{NOR}: 21,0 meses) en relación con aquellos gliomas que presentan la alteración.

Estos resultados indicarían que la amplificación o delección de los exones estudiados por esta metodología en estos genes serviría como un factor pronóstico para los tumores gliales.

En gliomas, especialmente en glioblastomas, la interacción entre el microRNA-26a-2 y *PTEN* juega un papel crítico en la progresión tumoral, resistencia a terapias y mal pronóstico. *MIR26A2* se une al 3'UTR del ARNm de *PTEN*, inhibiendo su traducción o promoviendo su degradación. Esto conduce a una disminución en la expresión de *PTEN* dando lugar a la activación constitutiva de la vía *PI3K/AKT/mTOR* (una ruta prosupervivencia y proliferación celular). Por lo que la sobreexpresión de *MIR26A2* suprime *PTEN*, lo que acelera el crecimiento tumoral.

Este efecto de agresividad biológica del tumor y resistencia terapéutica debido a la amplificación de *MIR26A2* se vería potenciado ante la delección del gen *PTEN*. La comparación de estas alteraciones para los 119 gliomas de la cohorte en estudio se detalla en la TABLA 23. Para evaluar esto, subdividimos la cohorte de 119 gliomas en subgrupos tumorales según:

- **subgrupo I:** tumores sin alteraciones en *MIR26A2* y el gen *PTEN*.
- **subgrupo II:** tumores sin amplificación de *MIR26A2*, pero delección del gen *PTEN*.
- **subgrupo III:** tumores con amplificación de *MIR26A2*, pero sin delección del gen *PTEN*.
- **subgrupo IV:** tumores con alteraciones en *MIR26A2* y el gen *PTEN*.

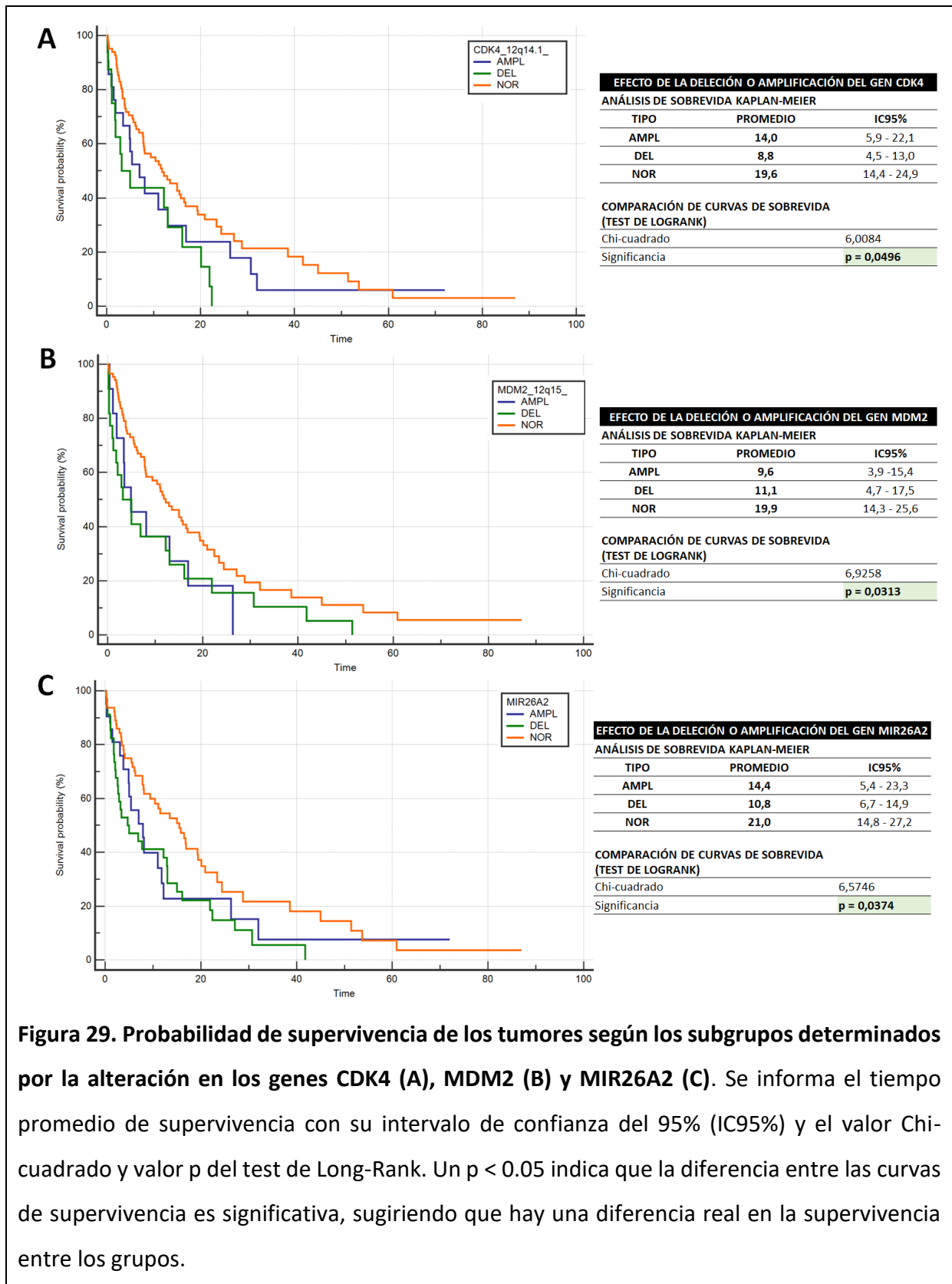


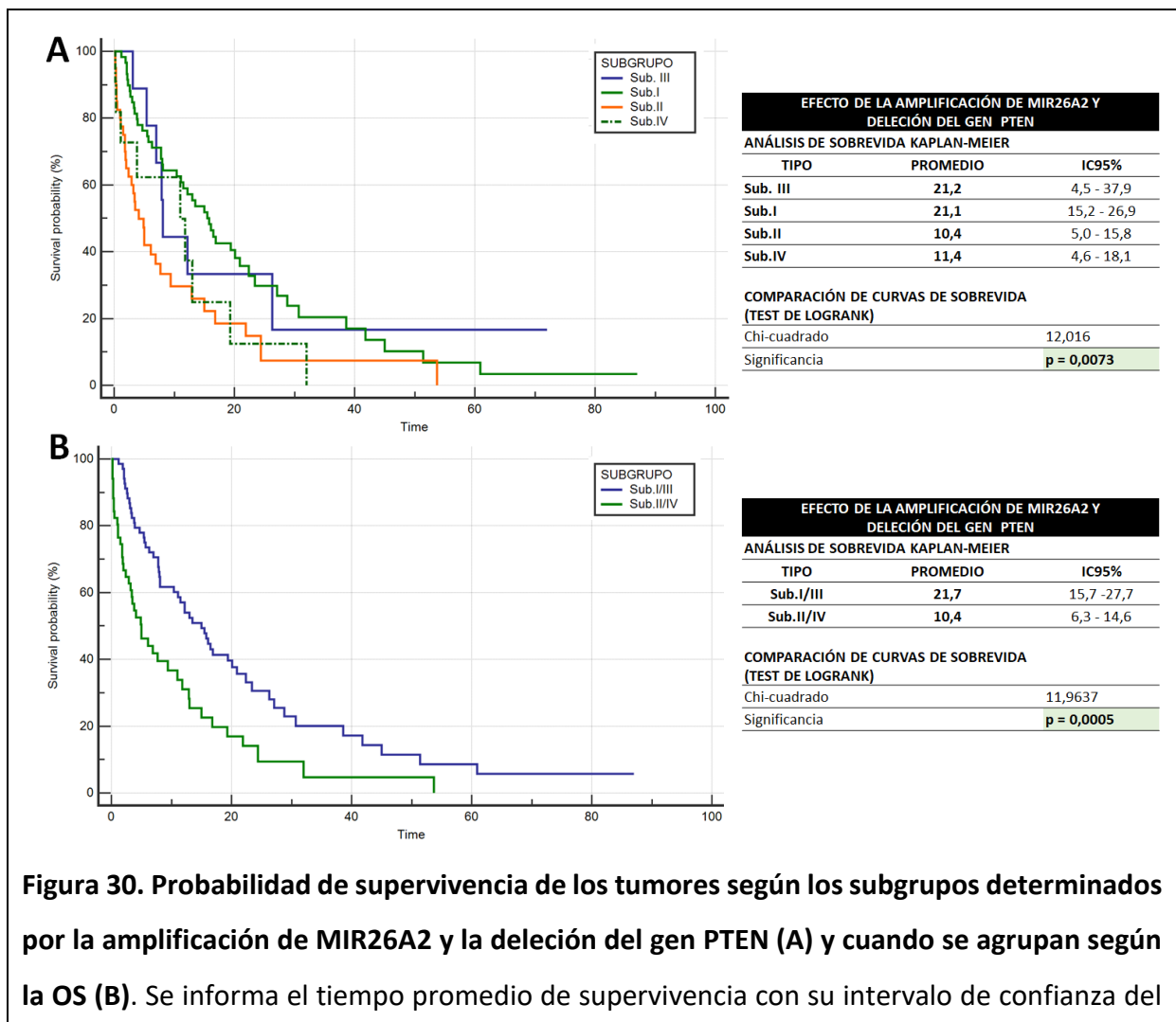
TABLA 23. Presencia de amplificación de MIR26A2 y delección del gen PTEN en los 119 gliomas.

	O IDHmut y CD-1p19q					AD IDHmut										AD IDHwt			
	Glio 09	H29	G28	G27	Glio 05	Glio 15	Glio 06	H27	Glio 13	G19	H11	H39	H34	G35	Glio 21				
MIR26A2_AMPL	SI	NO	NO	SI	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO				
PTEN_DEL	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	SI				
	OA IDHmut y CD-1p19q			AA IDHmut						AA IDHwt									
	G20	H22	Glio 22	H20	H18	M7463	H06	H41	H24	Glio 19	H09	G25	H30	H45	M8597	H48	Glio 04	H21	H31
MIR26A2_AMPL	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	SI	NO	NO	NO	NO	NO	NO	SI	NO	NO	NO
PTEN_DEL	NO	NO	NO	NO	NO	SI	NO	SI	NO	NO	NO	NO	SI	NO	NO	NO	SI	NO	NO
	M8961	Glio 08	M7464	H15	Glio 16	Glio 07	M7698	H35	Glio 20	M7816	G23	G30	H28	G33	G32	G45	Glio 02	Glio 10	G46
	GBM IDHmut							GBM IDHwt											
MIR26A2_AMPL	NO	NO	NO	NO	SI	NO	SI	SI	NO	NO	SI	NO	NO	NO	NO	NO	NO	SI	NO
PTEN_DEL	SI	NO	NO	SI	SI	SI	SI	SI	SI	NO	NO	SI	SI	SI	NO	SI	NO	SI	SI
	Glio 18	H01	G22	G43	G44	Glio 01	H37	G49	H23	H47	M7465	G09	H10	H26	G37	H12	G36	H50	H02
	GBM IDHwt																		
MIR26A2_AMPL	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	SI	NO	NO	SI	NO	NO	NO	NO	NO	SI	NO
PTEN_DEL	NO	NO	NO	NO	SI	SI	SI	NO	NO	NO	NO	SI	NO	NO	NO	SI	SI	SI	SI
	G18	M7558	G40	H05	Glio 12	H08	G12	H19	G39	H32	G10	H13	G42	H03	H40	H16	H17	G31	H42
	GBM IDHwt																		
MIR26A2_AMPL	NO	NO	SI	SI	SI	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	SI	NO
PTEN_DEL	NO	NO	SI	SI	SI	SI	NO	SI	SI	NO	SI	SI	NO	SI	NO	NO	SI	NO	SI
	M7545	G11	G48	H49	G47	Glio 03	Glio 14	G21	G26	H43	G29	G01	G16	G24	Glio 11	G02	H25	H38	G14
	GBM IDHwt																		
MIR26A2_AMPL	SI	NO	NO	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	NO	NO	NO	SI	NO	NO	NO	NO	NO
PTEN_DEL	SI	NO	SI	SI	SI	SI	NO	NO	NO	SI	NO	NO	NO	SI	SI	SI	SI	NO	SI

	H36	H46	M8376	H44	G03	G15	G17	G05	G08
	GBM IDHwt								
MIR26A2_ AMPL	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
PTEN_DEL	SI	NO	NO	NO	SI	NO	NO	NO	SI
O: oligodendroglioma. OA: oligodendroglioma anaplásico. AD: astrocitoma difuso. AA: astrocitoma anaplásico. GBM: glioblastoma. mut: mutado. wt: salvaje o wild type.									

La curva de OS de estos subgrupos tumorales (FIGURA 30A) permite determinar un peor pronóstico para los subgrupos II y IV (OS-Sub.II: 10,4 meses y OS-Sub.IV: 11,4 meses) con respecto a los otros subgrupos (OS-Sub.I: 21,1 meses y OS-Sub.III: 21,2 meses). Sin embargo, no se evidencia diferencia estadísticamente significativa para la OS entre los subgrupos II y IV, y entre los subgrupos I y III. Esto podría significar que el efecto pronóstico de la delección de PTEN como biomarcador es determinante cuando se compara con la amplificación de MIR26A2. Para corroborar esto, se realizó la curva de OS unificando estos subgrupos tumorales según (FIGURA 30B):

- **subgrupo I / III:** OS de 21,1 meses - comprende a los tumores sin delección del gen PTEN y con o sin alteraciones en MIR26A2)
- **subgrupo II / IV:** OS de 10,4 meses - comprende a los tumores con delección del gen PTEN y con o sin alteraciones en MIR26A2.



95% (IC95%) y el valor Chi-cuadrado y valor p del test de Long-Rank. Un $p < 0.05$ indica que la diferencia entre las curvas de supervivencia es significativa, sugiriendo que hay una diferencia real en la supervivencia entre los grupos.

3.3.7. Análisis del gen NFKBIA

El gen NFKBIA (*Nuclear Factor Kappa B Inhibitor Alpha*) se localiza en el cromosoma 14 (14q13.2), consta de 6 exones y codifica para la proteína I κ B α , un inhibidor clave del NF- κ B (Factor Nuclear Kappa B) al cual se une en el citoplasma, impidiendo su translocación al núcleo y su actividad transcripcional. Al controlar NF- κ B, modula la expresión de genes proinflamatorios y antiapoptóticos, y participa en la respuesta a estrés oxidativo, radiación y quimioterapia [104]. En gliomas, especialmente en el glioblastoma, se describió LOH en 14q (LOH-14q) en donde se localiza NFKBIA [105].

La metodología MLPA puede utilizarse para evaluar el estado de ploidía del gen NFKBIA. En la Probemix P105 se incluyen 3 sondas MLPA que hibridan en los exones 3, 4 y 5 del gen. Para la interpretación de los resultados del estado de ploidía del gen NFKBIA se consideró: i) un *ratio* promedio $< 0,75$ como indicativo de delección y ii) un *ratio* promedio $> 1,25$ como indicativo de amplificación génica.

Se ha sugerido que la delección del gen NFKBIA y la amplificación del gen EGFR siguen un patrón de exclusividad mutua dado que ambas alteraciones ejercen una función biológica similar o redundante y, por lo tanto, para el tumor, adquirir ambas no proporciona una ventaja adicional significativa y podría incluso ser perjudicial [106]. Es por ello, que la delección del gen NFKBIA podría sustituir la amplificación del gen EGFR como biomarcador pronóstico. Sin embargo, en nuestra cohorte, 3 de los 4 glioblastomas IDHwt con delección del gen NFKBIA presentan amplificación del gen EGFR.

En la TABLA 24 se resumen la frecuencia de la alteración por entidad tumoral mientras que los resultados del número de copias para los genes NFKBIA de los 119 gliomas de la cohorte en estudio se detallan en la TABLA 25. Además, en esta última tabla se muestran aquellos tumores que presentaron amplificación del gen EGFR.

TABLA 24. Frecuencia de alteraciones en el gen NFKBIA en los 119 gliomas.		
ENTIDAD	GRADO	N° CASOS
		Delección / Totales
Astrocitoma difuso		
Astrocitoma difuso, IDHmut	2	0 / 9
Astrocitoma difuso, IDHwt	2	1 / 1
Astrocitoma anaplásico		
Astrocitoma anaplásico, IDHmut	3	0 / 6
Astrocitoma anaplásico, IDHwt	3	1 / 10
Glioblastoma		
Glioblastoma, IDHmut	4	0 / 7
Glioblastoma, IDHwt	4	4 / 78
Oligodendroglioma		
Oligodendroglioma, IDHmut y CD-1p/19q	2	0 / 5
Oligodendroglioma anaplásico		
Oligodendroglioma anaplásico, IDHmut y CD-1p/19q	3	0 / 3

Dada la baja frecuencia de esta alteración en la cohorte estudiada, no es posible realizar el análisis estadístico por medio de las curvas de Kaplan-Meyer para determinar su capacidad pronóstica. Por otro lado, 3 de los 5 tumores que presentaron delección en el gen NFKBIA también tuvieron amplificación del gen EGFR, por lo que no podemos confirmar el patrón de exclusividad mutua descrito para ambos genes.

TABLA 25. Presencia de delección en NFKB1A en los 119 gliomas.

	O IDHmut y CD-1p19q					AD IDHmut										AD IDHwt			
	Glio 09	H29	G28	G27	Glio 05	Glio 15	Glio 06	H27	Glio 13	G19	H11	H39	H34	G35	Glio 21				
NFKB1A	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	DEL (0,64)				
EGFR_AMPL	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	SI	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR				
	OA IDHmut y CD-1p19q			AA IDHmut						AA IDHwt									
	G20	H22	Glio 22	H20	H18	M7463	H06	H41	H24	Glio 19	H09	G25	H30	H45	M8597	H48	Glio 04	H21	H31
NFKB1A	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR
EGFR_AMPL	NOR	NOR	NOR	SI	NOR	NOR	SI	NOR	SI	NOR	SI	NOR	SI	SI	NOR	SI	SI	NOR	SI
	M8961	Glio 08	M7464	H15	Glio 16	Glio 07	M7698	H35	Glio 20	M7816	G23	G30	H28	G33	G32	G45	Glio 02	Glio 10	G46
	GBM IDHmut							GBM IDHwt											
NFKB1A	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	DEL (0,47)	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR
EGFR_AMPL	NOR	NOR	NOR	NOR	SI	NOR	SI	NOR	NOR	NOR	NOR	SI	SI	NOR	NOR	SI	NOR	SI	NOR
	Glio 18	H01	G22	G43	G44	Glio 01	H37	G49	H23	H47	M7465	G09	H10	H26	G37	H12	G36	H50	H02
	GBM IDHwt																		
NFKB1A	DEL (0,62)	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	DEL (0,50)	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR
EGFR_AMPL	SI	SI	SI	NOR	NOR	NOR	NOR	SI	NOR	SI	SI	SI	NOR	NOR	NOR	SI	SI	SI	SI
	G18	M7558	G40	H05	Glio 12	H08	G12	H19	G39	H32	G10	H13	G42	H03	H40	H16	H17	G31	H42
	GBM IDHwt																		
NFKB1A	NOR	DEL (0,35)	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR
EGFR_AMPL	NOR	SI	NOR	SI	SI	SI	NOR	SI	SI	NOR	SI	SI	NOR	SI	SI	NOR	SI	SI	SI
	M7545	G11	G48	H49	G47	Glio 03	Glio 14	G21	G26	H43	G29	G01	G16	G24	Glio 11	G02	H25	H38	G14
	GBM IDHwt																		
NFKB1A	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR
EGFR_AMPL	SI	NOR	SI	SI	SI	SI	NOR	NOR	SI	SI	NOR	SI	NOR	SI	NOR	SI	SI	SI	NOR
	H36	H46	M8376	H44	G03	G15	G17	G05	G08										
	GBM IDHwt																		
NFKB1A	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR										
EGFR_AMPL	SI	NOR	SI	SI	SI	NOR	SI	SI	SI										

O: oligodendroglioma. OA: oligodendroglioma anaplásico. AD: astrocitoma difuso. AA: astrocitoma anaplásico. GBM: glioblastoma. mut: mutado. wt: wild type.

3.3.8. Análisis del gen TP53

El gen TP53 (*Tumor Protein 53*) se localiza en el cromosoma 17 (17p13.1), consta de 11 exones y codifica para la proteína p53 que previene la proliferación de células dañadas, mediante la detención del ciclo celular en fase G1 para permitir la reparación del ADN dañado, la inducción de la muerte celular programada y modulación del metabolismo celular para evitar el crecimiento anormal [107]. En gliomas, especialmente en astrocitomas difusos y glioblastomas IDHmut, se describió LOH en 17p (LOH-17p) en donde se localiza TP53 [108]. La metodología MLPA puede utilizarse para evaluar el estado de ploidía del gen TP53. En la Probemix P105 se incluyen 8 sondas MLPA que hibridan en los exones 1 al 5, 7, 10 y 11 del gen. Para la interpretación de los resultados del estado de ploidía del gen NFKBIA se consideró un *ratio* promedio < 0,75 como indicativo de delección y un *ratio* promedio > 1,25 como indicativo de amplificación génica.

En la TABLA 26 se resumen la frecuencia de la alteración por entidad tumoral mientras que los resultados del número de copias para los genes TP53 de los 119 gliomas de la cohorte en estudio se detallan en la TABLA 27. Dada la baja frecuencia de esta alteración en la cohorte estudiada, no es posible realizar el análisis estadístico por medio de las curvas de Kaplan-Meier para determinar su capacidad pronóstica. Por otro lado, solo se observó esta alteración en glioblastomas IDHwt.

TABLA 26. Frecuencia de alteraciones en el gen TP53 en los 119 gliomas.		
ENTIDAD	GRADO	N° CASOS
		Delección / Totales
Astrocitoma difuso		
Astrocitoma difuso, IDHmut	2	0 / 9
Astrocitoma difuso, IDHwt	2	0 / 1
Astrocitoma anaplásico		
Astrocitoma anaplásico, IDHmut	3	0 / 6
Astrocitoma anaplásico, IDHwt	3	0 / 10
Glioblastoma		
Glioblastoma, IDHmut	4	0 / 7
Glioblastoma, IDHwt	4	6 / 78
Oligodendroglioma		
Oligodendroglioma, IDHmut y CD-1p/19q	2	0 / 5
Oligodendroglioma anaplásico		
Oligodendroglioma anaplásico, IDHmut y CD-1p/19q	3	0 / 3

TABLA 27. Presencia de delección del gen TP53 en los 119 gliomas.

	O IDHmut y CD-1p19q					AD IDHmut										AD IDHwt						
	Glio 09	H29	G28	G27	Glio 05	Glio 15	Glio 06	H27	Glio 13	G19	H11	H39	H34	G35	Glio 21							
TP53 (17p13.1)	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR						
	OA IDHmut y CD-1p19q			AA IDHmut							AA IDHwt											
	G20	H22	Glio 22	H20	H18	M7463	H06	H41	H24	Glio 19	H09	G25	H30	H45	M8597	H48	Glio 04	H21	H31			
TP53 (17p13.1)	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR			
	M8961	Glio 08	M7464	H15	Glio 16	Glio 07	M7698	H35	Glio 20	M7816	G23	G30	H28	G33	G32	G45	Glio 02	Glio 10	G46			
	GBM IDHmut							GBM IDHwt														
TP53 (17p13.1)	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	DEL (0,52)	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR			
	Glio 18	H01	G22	G43	G44	Glio 01	H37	G49	H23	H47	M7465	G09	H10	H26	G37	H12	G36	H50	H02			
	GBM IDHwt																					
TP53 (17p13.1)	DEL (0,25)	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	DEL (0,38)	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR			
	G18	M7558	G40	H05	Glio 12	H08	G12	H19	G39	H32	G10	H13	G42	H03	H40	H16	H17	G31	H42			
	GBM IDHwt																					
TP53 (17p13.1)	NOR	DEL (0,29)	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR			
	M7545	G11	G48	H49	G47	Glio 03	Glio 14	G21	G26	H43	G29	G01	G16	G24	Glio 11	G02	H25	H38	G14			
	GBM IDHwt																					
TP53 (17p13.1)	DEL (0,74)	DEL (0,55)	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR			
	H36	H46	M8376	H44	G03	G15	G17	G05	G08													
	GBM IDH wt																					
TP53 (17p13.1)	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR													

O: oligodendroglioma. OA: oligodendroglioma anaplásico. AD: astrocitoma difuso. AA: astrocitoma anaplásico. GBM: glioblastoma. mut: mutado. wt: salvaje o wild type.

4. DISCUSIÓN

4.1. Características de los pacientes

En el presente proyecto de tesis evaluamos el impacto del enfoque integrado (criterios histopatológicos más alteraciones moleculares) de la clasificación de 2016 de la OMS para los tumores del SNC en una cohorte de 119 gliomas difusos de pacientes argentinos. Estos casos habían sido previamente diagnosticados según la clasificación de la OMS de 2007, basada únicamente en características histológicas (celularidad, atipia nuclear, actividad mitótica, proliferación vascular y presencia de necrosis). Sin embargo, esta clasificación presentaba importantes limitaciones debido a la variabilidad inter-observador y a la heterogeneidad pronóstica observada en tumores con características histológicas similares.

La caracterización de los pacientes incluidos en esta cohorte permitió establecer un perfil demográfico y clínico representativo de la población afectada por tumores gliales. En nuestra cohorte, se observó un predominio del sexo masculino (65%), con una edad media de 52 años en varones y 55 años en mujeres. Esta distribución por sexo concuerda con lo reportado en la literatura, donde varios estudios epidemiológicos han descrito una mayor incidencia de gliomas en varones, particularmente a partir de la quinta década de vida [109]. La distribución etaria indica que más del 75% de los pacientes tenía 55 años o más al momento del diagnóstico, lo cual refleja la tendencia observada en estudios epidemiológicos que vinculan la aparición de gliomas con el envejecimiento y con cambios moleculares acumulativos en el tiempo, así como con una menor capacidad regenerativa del tejido neural en edades avanzadas. Datos del CBTRUS (*Central Brain Tumor Registry of the United States*) y de registros europeos [110] [111] indican que los gliomas, particularmente los glioblastomas, presentan una relación hombre-mujer de aproximadamente 1.3 a 1.6:1, consistente con nuestros hallazgos. En cuanto a la distribución por edad, el 76% de los pacientes tenían 55 años o más, lo cual también coincide con lo descrito previamente, ya que la incidencia de gliomas tiende a aumentar con la edad, especialmente en el caso de los glioblastomas, que son más frecuentes en adultos mayores [110].

Un hallazgo relevante en esta cohorte fue la proporción de tumores previamente clasificados como “no definidos” o con diagnóstico mixto (oligoastrocitoma, glioma no clasificado), que representan un 9% de los casos. Este porcentaje reflejó la dificultad diagnóstica que implica

el uso exclusivo de criterios histológicos, subrayando la necesidad de un abordaje diagnóstico más integral que incluya marcadores moleculares.

En este contexto, la nueva clasificación propuesta por la OMS en 2016, basada en un enfoque integrado que combina hallazgos histopatológicos con perfiles moleculares (estado de mutación IDH y CD-1p/19q), permitió reclasificar el 27% de los casos. Este hallazgo ha validado la hipótesis de que la caracterización molecular aporta un valor significativo a la precisión diagnóstica y pronóstica de los gliomas, especialmente en aquellos casos de histología ambigua o atípica.

En todos los casos se observó positividad para GFAP, confirmando el origen glial de los tumores. La expresión del índice proliferativo Ki-67 permitió un primer acercamiento al grado tumoral, mientras que la ausencia casi generalizada de expresión de sinaptofisina excluyó componentes neuronales significativos, lo cual reafirma la naturaleza glial de las lesiones. Sin embargo, se identificó positividad focal para sinaptofisina en un pequeño porcentaje de tumores, especialmente en algunos glioblastomas IDHwt y astrocitomas anaplásicos, hecho que ha sido descrito previamente en la literatura y que sugiere la posibilidad de diferenciación neuronal parcial en ciertos gliomas [112].

4.2. Biomarcadores y reclasificación de los gliomas según OMS 2016

La mutación de IDH más frecuente en los gliomas difusos fue R132H del gen IDH1, que puede detectarse confiablemente con la tinción inmunohistoquímica para IDH1-R132H. Si bien esta metodología es eficiente en el trabajo rutinario en un laboratorio de anatomía patológica realizándose a partir del mismo bloque de parafina utilizado para el diagnóstico histológico estándar, solo detecta la mutación más frecuente en gliomas, es decir, p.R132H en la proteína IDH1. Dentro de la cohorte estudiada, otras cuatro mutaciones en IDH (R132C del gen IDH1 y R172G, R172C y R172K del gen IDH2) estuvieron presente y no pudieron detectarse mediante la tinción inmunohistoquímica, causando un diagnóstico erróneo de estos tumores. Dos de estas cuatro mutaciones (R132C-IDH1 y R172K-IDH2) pudieron ser detectadas por técnica de MLPA, dado que las Probemixes P088 y ME012 permiten detectar las variantes puntuales más comunes de los genes IDH1 (R132H y R132C) e IDH2 (R172K y R172M). Sin embargo, las variantes R172G y R172S en el gen IDH2, mutaciones menos frecuentes, presentes cada una de ellas en un paciente de la cohorte, sólo pudieron detectarse mediante secuenciación Sanger. Estos resultados indican la importancia de la elección acertada de métodos utilizados

para la detección de mutaciones en IDH, especialmente en pacientes jóvenes. Esto permite enfatizar la necesidad del uso de la secuenciación génica como la mejor herramienta para detectar todas las posibles variantes [113]. Cabe remarcar que en los gliomas IDHmut, la CD-1p/19q es patognomónica para oligodendrogliomas [114].

En cuanto a la CD-1p/19q, se detectó en ocho tumores, todos en combinación con una mutación IDH, lo cual es coherente con la definición molecular de los oligodendrogliomas según la OMS 2016. Esta estrecha asociación resalta el valor de la CD-1p/19q como marcador distintivo del linaje oligodendroglial. La variabilidad entre diferentes estudios demuestra la dificultad de un diagnóstico correcto de este subgrupo tumoral sin la introducción de biomarcadores moleculares [115].

La aplicación del enfoque integrado permitió dividir a los 119 gliomas en ocho subgrupos definidos, con una fuerte predominancia del glioblastoma IDHwt (65,6%), seguido por subgrupos de astrocitomas y oligodendrogliomas IDHmut de distintos grados. Esta distribución es coherente con la literatura, que indica que el glioblastoma IDHwt constituye la forma más frecuente y agresiva de tumor glial en adultos [116]. Todos los gliomas clasificados como glioblastoma según la clasificación de la OMS de 2007 permanecieron igual tras la revisión de los casos y los análisis moleculares realizados, indicando que los criterios morfológicos para glioblastoma fueron inequívocos. No obstante, el hecho de poder diferenciar entre glioblastomas IDHmut y IDHwt aporta valor pronóstico adicional.

Un hallazgo particularmente relevante fue que la reclasificación impactó en el diagnóstico del 27% de los casos, siendo más frecuente en astrocitomas (35%) y oligodendrogliomas (60%). Esto demuestra que el uso exclusivo de criterios histológicos puede conducir a una clasificación inadecuada, especialmente en tumores de bajo grado o con fenotipos mixtos. De esta manera, se propone que el diagnóstico de oligoastrocitomas debería ser extremadamente raro, ya que estos tumores pueden reclasificarse como astrocitoma u oligodendroglioma al incorporar datos moleculares y citogenéticos [117]. Además, en el 18,5% de los casos hubo modificación en el grado histológico tras la incorporación del índice proliferativo (Ki-67) y los biomarcadores moleculares, y en el 95% de ellos este cambio representó un ascenso de grado de 2 a 3. Esto tiene profundas implicancias terapéuticas, ya que influye en la decisión de iniciar tratamiento adyuvante con radioterapia y/o quimioterapia.

En este trabajo se utiliza la OS dado que es el indicador más sólido y objetivo en oncología para reflejar la efectividad global de las estrategias de tratamiento para prolongar la vida. Para ello, utilizamos curvas de Kaplan-Meier, método estadístico que estima la probabilidad de que un paciente permanezca vivo a lo largo del tiempo con un seguimiento de 2 años de los pacientes. Este plazo es muy relevante en gliomas de alto grado, donde la supervivencia media suele ser corta, y en gliomas de bajo grado donde puede superarse la mediana de supervivencia, lo que refuerza aún más el excelente valor pronóstico que aporta este método. Es importante indicar que las curvas Kaplan-Meier muestran asociación y no causalidad, y puede estar influenciada por otros factores como la edad, el estado funcional del paciente y la extensión de la resección quirúrgica. A pesar de estas limitaciones un análisis de OS con Kaplan-Meier a 2 años es una herramienta gráfica y estadística poderosa que demuestra de manera inequívoca la división pronóstica en subgrupos tumorales que antes se consideraban enfermedades homogéneas.

Cuando analizamos las clasificaciones de OMS-2007 y OMS-2016 de los gliomas, observamos que ambas clasificaciones tuvieron un valor pronóstico para la OS principal en todos los grupos (FIGURA 11): $p = 0,0001$ y $p < 0,0001$, respectivamente. Los pacientes con gliomas de grado 2 tuvieron una OS más prolongada (35,6 meses OMS-2007 vs 47,7 meses OMS-2016) que aquellos con gliomas de grado 3 (26,7 meses OMS-2007 vs 27,1 meses OMS-2016) y 4 (10,4 meses OMS-2007 vs 11,1 meses OMS-2016) en ambas clasificaciones. Encontramos que la clasificación de la OMS 2016 fue altamente precisa para predecir la OS, confirmando el valor de añadir estudios moleculares al diagnóstico, especialmente la CD-1p/19q para definir la estirpe tumoral.

Cuando se introduce el estado mutacional de IDH como variable, se observa una marcada diferencia en la OS dentro de cada grado tumoral (FIGURA 12). En efecto, los gliomas IDHmut mostraron consistentemente una supervivencia global más prolongada que sus contrapartes IDHwt, tanto en grado 2 (47,5 vs. 9,0 meses), grado 3 (18,0 vs. 10,8 meses) como en grado 4 (17,4 vs. 10,2 meses), lo cual refuerza su utilidad como biomarcador pronóstico independiente. Estos datos concuerdan con estudios previos que indican que los gliomas IDHmut se asocian con un mejor pronóstico que los tumores IDHwt [118]. Estas mutaciones no inhiben la enzima, sino que le aportan una actividad aberrante (neofoma) la cual transforma el α -cetoglutarato en D2HG, un oncometabolito que se acumula en altos niveles en la célula tumoral inhibiendo a las dioxigenasas dependientes de α -cetoglutarato. De esta

forma altera la epigenética de la célula por modificación de estado de metilación del ADN e histonas, de forma que las células tumorales permanecen en un estado indiferenciado, inmortal y proliferativo, incapaces de madurar a células normales [119].

El estado mutacional de los genes IDH no sólo es un biomarcador molecular predictivo, sino que permite seleccionar a los pacientes para terapias dirigidas con **inhibidores de IDH**, maximizando la eficacia y minimizando la toxicidad, principios fundamentales de la medicina de precisión. Estas moléculas se unen específicamente al sitio activo de la enzima IDH mutada, impidiendo que produzca el oncometabolito D2HG. Al reducir drásticamente los niveles de D2HG, se levanta el bloqueo epigenético. Las células del glioma pueden reiniciar su proceso de diferenciación, madurando hacia un tipo celular más parecido a un astrocito normal. Esto frena su proliferación descontrolada y lleva a una regresión del tumor.

Actualmente los fármacos inhibidores de IDH aprobados para su uso son:

- **Ivosidenib (Tibsovo®)**: inhibidor específico de la proteína IDH1 mutada, aprobado en febrero de 2023 por la FDA (*Food and Drug Administration*) para el tratamiento de adultos con astrocitoma difuso recurrente o refractario de grado 2 con mutación IDH1 [120]. El estudio de Fase 3 INDIGO (NCT04164901) sobre una población de 148 pacientes adultos que habían progresado tras cirugía y/o radioterapia, pero que aún no habían recibido quimioterapia, demostró que Ivosidenib mejora dramática y estadísticamente significativa la sobrevida en los pacientes, con un perfil de seguridad favorable [121].
- **Olutasidenib (Rezlidhia®)**: inhibidor específico de la proteína IDH1 mutada, aprobado por la FDA para leucemia mieloide aguda recurrente y refractaria con mutación IDH1 [122]. El estudio clínico NCT03564821 evaluó la seguridad y eficacia de olutasidenib en pacientes con gliomas grado 2-4 con mutación IDH1 que habían progresado después de tratamientos previos. Los datos de Fase 2 son robustos y la compañía propietaria (*Rigel Pharmaceuticals*) está en proceso de solicitar la aprobación formal a la FDA para el tratamiento de gliomas recurrentes con mutación IDH1.
- **Vorasidenib (Voranigo™)**: inhibidor oral, selectivo y potente de las enzimas mutantes IDH1 e IDH2 (*inhibidor dual*), diseñado para cruzar eficazmente la barrera hematoencefálica y alcanzar concentraciones terapéuticas en el tumor [123]. Ha mostrado resultados extraordinarios en el ensayo clínico de Fase 3 INDIGO (NCT04164901) para gliomas IDHmut de grado 2 y 3, retrasando significativamente la progresión de la enfermedad [121]. Está pendiente de aprobación formal para este uso. A diferencia de otros fármacos aprobados

para la recurrencia, Vorasidenib se administra inmediatamente después de la primera progresión radiológica, mucho antes de que los pacientes necesiten quimioterapia. Por ello, se retrasa la quimioterapia o radioterapia durante años, preservando la calidad de vida. Se espera su aprobación próximamente por las agencias regulatorias, convirtiéndose en el nuevo estándar de cuidado para esta población específica de pacientes.

En nuestro estudio, pudimos reclasificar los grados tumorales basándonos en la OS y no utilizando el índice de proliferación celular con inmunohistoquímica para Ki-67 (FIGURA 13). Estudios previos en tumores astrocíticos reportaron que este índice no puede determinar correctamente el grado de la OMS ni estimar la OS de los pacientes [124]. Con base en los resultados de supervivencia, se propone una nueva estratificación en 3 subgrupos:

- *Subgrupo I:* tumores IDHwt de grado 3 y 4, de peor pronóstico (OS: 10,5 meses).
- *Subgrupo II:* glioblastomas IDHmut, con supervivencia intermedia (OS: 17,4 meses).
- *Subgrupo III:* tumores IDHmut de grado 2 y 3, de mejor supervivencia (OS: 34,7 meses).

Este modelo integrador demuestra que la estratificación por estado molecular y grado histológico conjunto es superior a la clasificación histológica aislada para predecir el curso clínico de los pacientes. La supervivencia del Subgrupo III se asemeja a la reportada en cohortes de oligodendrogliomas IDHmut con CD-1p/19q (OS: 10 – 15 años) y astrocitomas IDHmut (OS: 5 – 10 años) [125].

4.3. Alteraciones moleculares en los genes relacionados a la gliomagénesis

El proceso de gliomagénesis implica la acumulación progresiva de alteraciones genéticas y epigenéticas que afectan vías clave de señalización celular. Una de las principales alteraciones epigenéticas estudiadas fue la metilación del pMGMT, un marcador ampliamente reconocido por su implicancia terapéutica. La metilación del pMGMT inactiva la expresión de la enzima MGMT responsable de reparar el daño en el ADN inducido por agentes alquilantes como la TMZ [42]. Por ello, los tumores con pMGMT metilado presentan una mayor sensibilidad a este tratamiento y mejor pronóstico global. Para el estudio del pMGMT, nosotros utilizamos la metodología MLPA que, además de determinar los patrones de metilación, permite estimar su número de copias alélicas (FIGURA 14).

En nuestra cohorte, los resultados confirmaron que la presencia de metilación en el pMGMT se asocia con una mayor OS tanto en tumores IDHmut como IDHwt (FIGURA 15). Aunque esta diferencia fue más pronunciada en los gliomas IDHmut (34,5 meses vs. 21,2 meses), también

fue significativa en los IDHwt (11,1 meses vs. 10,4 meses), lo que indica que la metilación de pMGMT actúa como un biomarcador pronóstico y predictivo independiente, incluso en los subtipos de peor pronóstico.

Dada las características genéticas del pMGMT que se componen de 97 islas CpG se descartó su estudio por tratamiento con bisulfito seguido de una PCR cualitativa de debido a que puede llevar a un mayor número de falsos negativos por la escasa cobertura de amplificación del “promotor mínimo”, una conversión con bisulfito incompleta y la no posibilidad de determinar el grado de metilación. Esta técnica podría complementarse con la pirosecuenciación de los productos amplificados (método de referencia), la que proporciona un porcentaje exacto de metilación para cada posición de CpG analizada. Sin embargo, el requerimiento de equipamiento especializado y costoso nos imposibilitó comparar con la metodología elegida (MS-MLPA), siendo esto una limitante para el estudio. Sin embargo, la metodología de MS-MLPA es un método comercial estandarizado de amplio uso en los laboratorios de patología molecular que permite superar la longitud de lectura limitada (~ 50 - 100 pb) del pMGMT de las técnicas mencionadas.

Un hallazgo relevante fue la evaluación del número de copias alélicas del pMGMT que pudo ser realizada en este estudio por el uso de la técnica de MS-MLPA (FIGURA 14). Cuando evaluamos la asociación entre la presencia de delección alélica del pMGMT con la OS (FIGURA 16), observamos que la delección en el pMGMT se asoció con un peor pronóstico en comparación con los tumores sin delección tanto solo en tumores IDHmut (OS: pMGMT_{DEL} 21,6 meses vs pMGMT_{NO-DEL} 37,6 meses) mientras que en tumores IDHwt la diferencia de OS no es significativa (OS: pMGMT_{DEL} 10,0 meses vs pMGMT_{NO-DEL} 11,0 meses).

Este resultado sugiere que la delección del pMGMT en tumores IDHmut tiene un valor pronóstico negativo, posiblemente por la pérdida de regulación epigenética que favorece un fenotipo más agresivo y desregulado, aún en presencia de metilación parcial. Es importante mencionar que la delección de gen MGMT (incluido su promotor) no suele ocurrir de forma aislada sino como parte de un patrón más amplio de inestabilidad cromosómica y pérdida de material genético. Un tumor que ha perdido el gen MGMT es probable que tenga otras delecciones y alteraciones genéticas concomitantes. En el contexto de tumores IDHmut, donde los mecanismos de reparación del ADN dependientes de TET y otras enzimas están inhibidos por la D2HG, se crea un entorno de alto estrés genotóxico donde el daño en el ADN se acumula más fácilmente. Sin bien, la delección de un alelo con ausencia o reducción de los

niveles de MGMT haría al tumor sensible a la TMZ, en este contexto de inestabilidad, la pérdida de MGMT priva a la célula tumoral de un mecanismo clave de reparación que le ayudaría a sobrevivir al daño genético acumulado espontáneamente. Esto acelera la acumulación de mutaciones adicionales que puede favorecer la aparición y selección de subclones tumorales que hayan adquirido mutaciones muy agresivas (por ejemplo, en genes como PIK3CA, PTEN, o incluso la pérdida de CDKN2A/B, que conducen a una progresión maligna más rápida y una resistencia terapéutica.

De esta forma, en tumores IDHmut, la delección del pMGMT podría ser marcador de un tumor genéticamente más inestable y propenso a evolucionar hacia una forma más agresiva, lo que en última instancia se traduce en una supervivencia general menor, a pesar de su inicial sensibilidad a la quimioterapia.

Al incorporar simultáneamente el grado histológico y el estado de IDH al análisis de delección en pMGMT (FIGURA 17A), se observa que pueden ser definidos subgrupos con diferencias marcadas en supervivencia (FIGURA 17B). Los astrocitomas IDHmut de grado 2 con delección del pMGMT mostraron la mejor OS (52,1 meses), mientras que los tumores IDHwt (de cualquier grado) presentaron la peor OS (10,6 meses). Este hallazgo apoya la hipótesis de que la delección del pMGMT puede modular el comportamiento clínico incluso dentro del subgrupo IDHmut, lo cual ha sido escasamente explorado en la literatura. Estos resultados coinciden con estudios previos que demostraron que el estado de metilación del promotor de MGMT no solo predice la respuesta a TMZ, sino que también tiene valor pronóstico *per se* [126]. No obstante, la interacción con el estado de delección del gen IDH, como se observa en este trabajo, representa un enfoque novedoso que sugiere que ambos factores deben considerarse en conjunto para una mejor estratificación de riesgo.

El gen PTEN actúa como un supresor tumoral clave en los gliomas al regular negativamente la vía PI3K/AKT/mTOR, implicada en la proliferación, supervivencia y crecimiento celular. Los resultados obtenidos mostraron una alta frecuencia de delecciones en PTEN entre los gliomas de alto grado (TABLA 12), especialmente en los glioblastomas IDHwt, donde se observó una pérdida en el 52% de los casos (41/78), lo que coincide con reportes previos del TCGA y otros estudios genómicos en grandes cohortes [21]. Por el contrario, los gliomas de bajo grado y aquellos IDHmut mostraron una baja frecuencia de alteraciones en PTEN, reforzando la idea de que la pérdida de este gen se asocia a formas más agresivas y menos diferenciadas de gliomas.

El análisis de supervivencia evidenció que la delección de PTEN constituye un fuerte marcador de mal pronóstico, con una mediana de OS de 7,8 meses en los tumores que presentan esta alteración, frente a 24,5 meses en aquellos con dos copias intactas del gen. Este hallazgo es consistente con la literatura, que ha asociado la pérdida de función de PTEN con un aumento en la proliferación celular, angiogénesis, resistencia a la apoptosis y una respuesta deficiente a la terapia estándar con temozolomida y radioterapia [127].

Cuando se evalúa la coexistencia de delección en PTEN con delección en pMGMT en los pacientes (FIGURA 19), se observa un mejor pronóstico para aquellos tumores sin delección de ambos genes (OS-subgrupo I: 24,5 meses) y un peor pronóstico para los tumores solo con delección PTEN (OS-subgrupo III: 7,8 meses). Ambos genes se localizan en el brazo largo del cromosoma 10 (gen PTEN: 10q23.31 y gen MGMT: 10q26.3). La pérdida de todo o parte del cromosoma 10 es una de las alteraciones genéticas más frecuentes que ocurren durante la gliomagénesis del Glioblastoma IDHwt. Esta delección masiva arrastra consigo múltiples genes supresores de tumores, entre los cuales PTEN es el más importante y conocido, pero no es el único, ya que MGMT también se ve afectado por este evento.

Como se mencionó previamente, la pérdida de PTEN confiere una ventaja selectiva directa a la célula tumoral, activando las vías de proliferación y supervivencia, siendo el objetivo principal de esta delección cromosómica. Por otro lado, la gran delección del brazo 10q arrastra a todos los genes de la región entre los que se incluye MGMT. La delección de MGMT en este contexto tiene profundas consecuencias terapéuticas, ya que puede hacer al tumor más sensible a la quimioterapia, mientras evoluciona la agresividad del tumor por la pérdida del gen supresor PTEN. Para corroborar esta hipótesis se debería estudiar en los tumores la pérdida del brazo largo del cromosoma 10 (LOH 10q) mediante FISH o Hibridación Genómica Comparativa basada en Arrays (array-CGH).

Cuando se evalúa la coexistencia de delección en PTEN en función del estado de metilación en pMGMT en los pacientes (FIGURA 20) se definen distintos subgrupos tumorales. Aquel subgrupo que incluye a los tumores sin delección del gen PTEN y pMGMT metilado presentó un mejor pronóstico (OS-subgrupo I: 27,8 meses) que aquel que abarca los tumores con delección PTEN y pMGMT no metilado (OS-subgrupo IV: 8,5 meses). Según lo observado, la agresividad biológica impulsada por la pérdida de PTEN superaría la resistencia al tratamiento conferida por el pMGMT no metilado, convirtiendo a la agresividad biológica en un factor pronóstico más potente que la sensibilidad a un fármaco específico. La pérdida de PTEN

define un tumor biológicamente más agresivo, y el hecho de que además sea resistente a la TMZ (pMGMT no metilado) consolida el peor pronóstico. El estado de metilación de pMGMT no afectaría a esta agresividad intrínseca, es decir, es irrelevante para su capacidad de crecer, invadir y sobrevivir por sí mismo. Además, la delección del gen PTEN a menudo ocurre en el contexto de una pérdida masiva del brazo largo del cromosoma 10 (LOH 10q). Este evento cromosómico implica que el tumor es genómicamente muy inestable y ha acumulado muchas otras alteraciones genéticas además de la pérdida de PTEN. Esta inestabilidad conduce a una heterogeneidad tumoral mayor y a una adaptabilidad más rápida, lo que empeora el pronóstico. Esto sugiere que la delección de PTEN actúa como un biomarcador pronóstico independiente, lo cual es particularmente relevante para la estratificación de riesgo en glioblastomas IDHwt. Además, en contextos moleculares más favorables (tumores IDHmut), la presencia de delección del gen PTEN revertiría parcialmente el pronóstico benigno asociado a las mutaciones IDH. Este dato es relevante clínicamente, ya que podría ayudar a identificar pacientes con gliomas IDHmut que podrían beneficiarse de un seguimiento más estrecho o de terapias dirigidas alternativas.

El análisis de las alteraciones en el gen EGFR ha evidenciado su papel central como biomarcador molecular en gliomas de alto grado, particularmente en el glioblastoma IDHwt, donde se observó una alta frecuencia de amplificación génica (47/78 casos), y en un subconjunto, la presencia concomitante de la variante EGFRvIII (11/47 casos) (TABLA 15).

La amplificación del gen EGFR, observada en el 60,3% de los glioblastomas IDHwt, se asoció significativamente con un peor pronóstico en términos de OS. En nuestra cohorte (FIGURA 22), los pacientes con gliomas EGFR amplificados presentaron una OS promedio de 13,6 meses, mientras que aquellos con amplificación alta mostraron un descenso más marcado (OS: 9,2 meses), en comparación con tumores sin esta alteración (OS: 21,9 meses). Estos hallazgos son consistentes con estudios previos que describen la amplificación de EGFR como un evento temprano y prevalente en glioblastomas primarios, impulsando la oncogénesis a través de una activación constitutiva de las vías PI3K/AKT/mTOR y RAS/MAPK [128].

En relación con la variante EGFRvIII, su detección se limitó a un subgrupo de los tumores con amplificación del gen EGFR (TABLA 15). Aunque su presencia se asocia a una mayor agresividad biológica y resistencia terapéutica, en nuestra cohorte no se observó una diferencia estadísticamente significativa en la OS entre los pacientes con tumores que presentan EGFRvIII respecto a aquellos con amplificación sin la variante [129]. Esta

observación sugiere que, si bien la presencia de EGFRvIII podría tener relevancia funcional y terapéutica, no constituye un biomarcador pronóstico independiente. La metodología MLPA empleada demostró ser eficaz para identificar tanto la amplificación del gen como la delección de los exones 2 al 7 que definen la variante EGFRvIII, lo cual representa una ventaja frente a otros métodos como FISH que no discriminan entre variantes estructurales.

En términos clínicos, nuestros resultados refuerzan la noción de que la amplificación del gen EGFR debería ser considerada un biomarcador pronóstico negativo en el manejo de pacientes con gliomas, particularmente en el contexto del glioblastoma IDHwt.

El EGFR como blanco terapéutico ha dado resultados satisfactorios en el tratamiento de diversas neoplasias como cáncer colorrectal, cáncer de pulmón de células no pequeñas y cáncer de páncreas, entre otros, pero no para los gliomas [130]. Los fármacos aprobados son principalmente TKI que interfieren con la señalización del receptor, o anticuerpos monoclonales que se dirigen al receptor en la superficie celular para interferir con la unión del ligando. Si bien, EGFR fue la primera molécula en vincularse con la oncogénesis en el glioblastoma, uno de los principales inconvenientes en el desarrollo de estas moléculas es la baja penetración de la BHE y los mecanismos de resistencia. Tres generaciones de TKI de EGFR están aprobadas para uso clínico. Sólo el Osimertinib (Tagrisso®), ITK de tercera generación, diseñado específicamente para dirigirse a las mutaciones activadoras de EGFR canónicas y la mutación de resistencia T790M, presenta una buena capacidad para cruzar la BHE [131]. Actualmente, se encuentra en estudio clínico Fase IIA, la molécula BioLink1006 (Patente concedida a *Protheragen Inc.*) que es un inhibidor no competitivo del dominio de unión al ATP del EGFR para el tratamiento del glioblastoma, astrocitoma anaplásico y otros cánceres cerebrales con alteración en el gen EGFR. Este fármaco presenta una excelente penetración de la BHE, un buen perfil de seguridad y alta selectividad frente a otras quinasas [132].

Por otro lado, la EGFRvIII representa un blanco terapéutico excepcional en gliomas debido a su especificidad tumoral y su papel conductor en la oncogénesis. EGFRvIII no se expresa en ningún tejido sano del cuerpo, siendo una proteína exclusiva de las células cancerosas. Esto crea una oportunidad única para desarrollar terapias que ataquen solo a las células tumorales, minimizando los efectos secundarios tóxicos sobre los tejidos sanos (ventana terapéutica amplia). La investigación actual se centra en terapias con células CAR-T anti-EGFRvIII, vacunas peptídicas y anticuerpos Fármaco-Conjugados. La clave del éxito futuro probablemente residirá en combinar estas terapias dirigidas con otras que aborden la heterogeneidad

tumoral y reviertan la inmunosupresión del microambiente, ofreciendo un mejor tratamiento para este subgrupo de pacientes [133].

En base a lo expuesto, podemos afirmar que EGFR es un pilar en el diagnóstico molecular y la estratificación pronóstica de los gliomas. Si bien aún no determina tratamientos estándar fuera de los ensayos clínicos, es fundamental para identificar a los pacientes que pueden beneficiarse de terapias dirigidas experimentales y personalizadas.

El locus CDKN2A/B (9p21.3) codifica proteínas supresoras tumorales clave en la regulación del ciclo celular:

- p16INK4a, codificada por CDKN2A, se une e inhibe a las enzimas CDK4 y CDK6. Sin esta inhibición, las CDK4/6 fosforilan e inactivan a la proteína Rb, lo que permite que la célula progrese de la fase G1 a la S del ciclo celular y se divida.
- p14ARF, codificada por el mismo locus CDKN2A, pero en un marco de lectura alternativo, se une a la proteína MDM2, inactivando así la degradación de la proteína supresora de tumores p53 y deteniendo el crecimiento celular.
- p15INK4b, codificada por CDKN2B, inhibe a CDK4/6.

En el contexto de los gliomas, la pérdida de este locus se reconoce como uno de los eventos más frecuentes asociados a gliomas de alto grado. En este estudio (TABLA 17), se detectó delección de CDKN2A/B en el 43,7% (52/119) de los casos, con una clara predilección por los gliomas astrocitarios de alto grado y por los tumores IDHwt. En contraste, los tumores IDHmut y los oligodendrogliomas CD-1p/19q positivos presentaron muy baja frecuencia de esta alteración, confirmando su valor como marcador diferencial.

Desde el punto de vista pronóstico (FIGURA 25), la delección del locus CDKN2A/B se asoció con una supervivencia significativamente reducida (OS: 9,8 meses) en comparación con los tumores sin esta alteración (OS: 23,4 meses). Esta diferencia refuerza la idea de que la pérdida de función de CDKN2A/B, al desinhibir la progresión del ciclo celular, confiere a las células tumorales una ventaja proliferativa que se traduce en mayor agresividad clínica.

Asimismo, se observó que no hubo diferencia significativa entre delecciones homocigotas y heterocigotas respecto a la OS (10,8 vs 8,3 meses), lo cual sugiere que la mera pérdida parcial de este locus puede ser suficiente para promover el fenotipo maligno (FIGURA 26). Esto es concordante con estudios previos que indican que incluso una delección monoalélica puede tener impacto funcional significativo si se acompaña de otras alteraciones epigenéticas o postraduccionales [134].

Es importante destacar que la alteración de CDKN2A/B no es exclusiva del glioblastoma IDHwt, sino que también se detectó en un subgrupo de astrocitomas anaplásicos IDHwt y, en menor proporción, IDHmut. Por tanto, su presencia podría ser un criterio complementario para la reclasificación y estratificación de riesgo, especialmente en aquellos tumores de grado intermedio.

Estos hallazgos tienen implicaciones clínicas relevantes. Por un lado, la delección de CDKN2A/B podría integrarse como biomarcador pronóstico independiente en el algoritmo diagnóstico. Por otro lado, podría abrir líneas terapéuticas específicas con inhibidores de CDK4/6 en pacientes con pérdida de p16, estrategia que ha mostrado beneficios en otros tumores y se encuentra en investigación en gliomas [135].

El gen PDGFRA, ubicado en 4q12, codifica un receptor tirosina quinasa esencial en los procesos de proliferación y supervivencia celular. En esta tesis, se evaluó su estado de ploidía mediante MLPA, identificando alteraciones (delección o amplificación) en el 26% de los casos, con una prevalencia marcada en glioblastomas IDHwt (TABLA 19). Se observaron deleciones en 21 casos (17,6%) y amplificaciones en 14 casos (11,8%), siendo estas alteraciones significativamente más frecuentes en gliomas de alto grado y de tipo IDHwt. Este patrón es consistente con reportes previos que vinculan las alteraciones en PDGFRA con la gliomagénesis temprana y con perfiles transcriptómicos más agresivos [136].

Desde un punto de vista pronóstico, los resultados obtenidos muestran que la presencia de alteraciones en PDGFRA se asocia a una menor OS, independientemente de si se trata de deleciones o amplificaciones (FIGURA 27). Cuando se evaluó si el tipo de alteración aportaba información pronóstica (FIGURA 28), se observan dos subgrupos bien definidos en base a la OS: aquel integrado por pacientes sin alteraciones en PDGFRA (OS: 20,3 meses), y un segundo grupo en donde se incluyen pacientes con deleciones (OS: 9,3 meses) y con amplificaciones (OS: 6,6 meses). Si bien la diferencia entre tipos de alteración no fue estadísticamente significativa, sí lo fue la comparación global entre tumores alterados y no alterados.

Esto indica que la alteración del gen PDGFRA, más allá de su naturaleza específica, se comporta como un biomarcador pronóstico negativo independiente, lo cual puede explicarse por la convergencia funcional de ambas alteraciones hacia la activación aberrante de las vías PI3K/AKT y RAS/MAPK, favoreciendo la proliferación, evasión de la apoptosis y la resistencia terapéutica. Desde el punto de vista metodológico, la técnica de MLPA demostró ser una

herramienta sensible para detectar tanto deleciones parciales como amplificaciones focales, permitiendo una evaluación precisa del estado del gen.

Los genes CDK4, MDM2 y MIR26A2, localizados en la región cromosómica 12q13–q15, constituyen un clúster funcional de relevancia en la regulación del ciclo celular, la respuesta al daño del ADN y la señalización oncogénica. En el contexto de los gliomas, particularmente en glioblastomas IDHwt, se ha documentado la co-amplificación de estos genes como un mecanismo convergente para favorecer la proliferación celular y la evasión de mecanismos de supresión tumoral.

En esta tesis, se evidenció que CDK4 estuvo amplificado en 28,6% de los casos (34/119), siendo más prevalente en glioblastomas IDHwt, MDM2 presentó amplificación o deleción en 30,3% de los casos (36/119), también con predominio en tumores de alto grado, y MIR26A2 mostró alteraciones en 43,7% de los casos (52/119), con un perfil muy heterogéneo entre los distintos subtipos (TABLA 22).

A pesar de que la amplificación aislada de estos genes no mostró una correlación significativa con la OS cuando se analizó por separado, el agrupamiento de cualquier alteración (amplificación o deleción) sí se asoció con un peor pronóstico:

- OS_[CDK4 alterado]: 13,6 meses vs OS_[CDK4 sin alteración]: 19,6 meses.
- OS_[MDM2 alterado]: 12,8 meses vs OS_[MDM2 sin alteración]: 19,9 meses.
- OS_[MIR26A2 alterado]: 13,1 meses vs OS_[MIR26A2 sin alteración]: 21,0 meses.

Estos datos sugieren que las alteraciones en estos genes podrían ser consideradas biomarcadores pronósticos independientes, en especial cuando se integran dentro de un perfil molecular más amplio que incluye alteraciones en PTEN, EGFR y CDKN2A/B.

En cuanto a MIR26A2, su amplificación adquiere un valor biológico relevante por su interacción directa con PTEN, uno de los principales reguladores negativos de la vía PI3K/AKT. MIR26A2 se une directamente al ARNm de PTEN y suprime su traducción, reduciendo los niveles de la proteína PTEN (silenciamiento post-transcripcional). MIR26A2 actúa también sobre otros genes, como RB1, PURA y MAP3K2/MEKK2. Al reprimir esta red de genes protectores, la amplificación de MIR26A2 impulsa la proliferación, supervivencia y malignidad de las células tumorales, convirtiéndose en un mecanismo muy eficiente para que el tumor active múltiples vías oncogénicas a la vez. Estos hallazgos ponen de manifiesto la interacción funcional entre microRNAs oncogénicos y genes supresores tumorales, y destaca el potencial de MIR26A2 como blanco terapéutico emergente [137].

La combinación de amplificación de MIR26A2 y delección de PTEN se asoció con una supervivencia significativamente reducida (OS: 11,4 meses), lo que sugiere un efecto sinérgico deletéreo (FIGURA 30A). En cambio, la presencia aislada de una sola de estas alteraciones no mostró la misma fuerza pronóstica. Cuando se unifican estos subgrupos tumorales (FIGURA 30B) evidenciamos que, independientemente de la presencia o no de alteraciones en MIR26A2, aquellos tumores sin delección del gen PTEN presentan una mayor OS (21,1 meses) que los tumores con delección en PTEN (10,4 meses). Esto se explica por el papel central de PTEN como regulador de una de las vías de señalización celular más críticas para el cáncer. La pérdida de PTEN confiere al tumor un fenotipo de ultra-agresividad, ya que tendría un impacto funcional más severo y constante que la regulación negativa (silenciamiento por microRNA). La razón por la que la delección de PTEN es un factor pronóstico tan dominante es porque representa la pérdida irreversible del control más importante sobre una vía de señalización oncogénica central. Esto confiere al tumor un fenotipo de agresividad biológica inherente y resistencia terapéutica que eclipsa los efectos de otros biomarcadores regulatorios como MIR26A2, lo que se traduce directamente en una OS significativamente reducida.

Desde un enfoque clínico, la amplificación de CDK4 y MDM2 podría representar una oportunidad terapéutica mediante el uso de inhibidores de CDK4/6, como Palbociclib (Ibrance®), o inhibidores de MDM2, actualmente en fase de evaluación clínica. Asimismo, los microRNAs como MIR26A2 están siendo estudiados como blancos de terapias antisentido o inhibidores de miRNA, lo que podría abrir nuevas vías para el tratamiento personalizado de gliomas con perfiles moleculares específicos [138].

El gen NFKBIA, localizado en 14q13.2, codifica la proteína IκBα, un regulador negativo crucial de la vía de señalización NF-κB, la cual controla múltiples procesos celulares como inflamación, supervivencia, proliferación y respuesta inmune. En condiciones fisiológicas, IκBα secuestra complejos NF-κB en el citoplasma, impidiendo su translocación al núcleo y la transcripción de genes proinflamatorios y antiapoptóticos. Su pérdida o inactivación, por tanto, conlleva una activación constitutiva de NF-κB, favoreciendo un fenotipo tumoral más agresivo.

La evaluación del estado de ploidía de NFKBIA mediante la técnica MLPA en nuestra cohorte (TABLA 23) demostró delección del gen en 5 casos, con predominio en glioblastomas IDHwt. Este hallazgo es coherente con estudios previos que identifican la delección de NFKBIA como

una alteración característica de gliomas de alto grado, en especial en tumores IDHwt [139]. En nuestra cohorte, la delección estuvo ausente en tumores IDHmut, lo que refuerza su asociación con formas más agresivas y mal diferenciadas de la enfermedad.

Dada la baja frecuencia de esta alteración en la cohorte estudiada, no fue posible realizar el análisis estadístico por medio de las curvas de Kaplan-Meyer para determinar su capacidad pronóstica. Si bien, esto podría explicarse por el tamaño muestral reducido del subgrupo con delección, es importante señalar que NFKBIA actúa como un biomarcador secundario, cuyo impacto se potencia cuando coexiste con otras alteraciones como CDKN2A/B, EGFR o PTEN.

Se ha sugerido que la pérdida de NFKBIA puede ser funcionalmente redundante con la amplificación de EGFR, ya que ambos convergen en la activación de NF- κ B [139]. En nuestro análisis, algunos tumores presentaron alteraciones concomitantes en ambos genes (de los 5 tumores con delección en NFKBIA, 3 tumores presentaban además amplificación del gen EGFR). Si bien algunos estudios [140] plantearon que ambas alteraciones tendrían exclusividad mutua porque redundan en la activación de la vía NF- κ B, otros estudios indicaron que la presencia concomitante de ambos biomarcadores permite definir un subgrupo molecular de glioma particularmente agresivo, especialmente glioblastoma IDHwt [141]. Esto podría deberse a que ambas alteraciones convergen en la activación de esta vía pro-supervivencia, vía del NF- κ B, pero lo hacen por mecanismos diferentes y complementarios. Mientras que el EGFR amplificado hiperactiva NF- κ B a través de intermediarios, la delección del gen NFKBIA activa la vía NF- κ B de forma directa al liberar el arresto. Este mecanismo dual conduce a una activación extremadamente potente y sostenida de las señales que les indican a las células que se dividan sin control a la vez que escapan de las señales apoptóticas.

Es importante señalar que la coexistencia de amplificación de EGFR y delección de NFKBIA suelen ser mutuamente excluyentes ante la presencia de mutación en los genes IDH. Esto refleja el hecho de que existen 2 vías patogénicas fundamentalmente diferentes que dan lugar a tumores con características clínicas y biológicas distintas. La mutación en los genes IDH actúa como un **evento iniciador temprano** que define un camino oncogénico específico de la gliomagénesis, que es incompatible con las alteraciones genéticas que caracterizan a los tumores IDHwt. El cambio epigenético masivo inducido por el oncometabolito D2HG aporta a la célula tumoral un estado diferenciado particular, activando vías de señalización que hacen que las ventajas proliferativas que confieren la amplificación del gen EGFR o la pérdida de

NFKBIA no sean necesarias o incluso puedan ser perjudiciales para la supervivencia de ese tipo específico de tumor.

El gen TP53, ubicado en 17p13.1, es uno de los genes supresores tumorales más relevantes en la oncogénesis humana. Codifica la proteína p53, un regulador maestro del ciclo celular, la reparación del ADN, la senescencia y la apoptosis.

En esta tesis, se estudió el gen TP53 por técnica de MLPA la cual permite detectar solamente la pérdida de 8 de los 11 exones del gen, dando evidencia de la posible delección completa de dicho gen. En nuestra cohorte, hemos podido establecer delección del gen TP53 en unos pocos casos (6/119) (TABLA 25), siendo exclusiva su distribución en glioblastoma IDHwt, lo cual está coincide con trabajos previos que describen mayor frecuencia de este tipo de alteración en esta estirpe tumoral. Por otro lado, algunos estudios han descrito que las delecciones en TP53 fueron altamente prevalentes en astrocitomas IDHmut [142], esto no pudo ser corroborado en nuestra cohorte, posiblemente por el bajo número estudiado de estos tumores.

Es importante señalar que las mutaciones puntuales en el gen TP53 son las más frecuentemente encontradas en gliomas, principalmente en Astrocitomas difusos IDHmut (80-90% de los casos) y glioblastoma IDHwt (alrededor del 25-30%). Esto es una limitante en nuestro estudio ya que la técnica de MLPA utilizada no permite detectar este tipo de alteraciones.

Dada la baja frecuencia de esta alteración en la cohorte estudiada, no fue posible realizar el análisis estadístico por medio de las curvas de Kaplan-Meyer para determinar su capacidad pronóstica.

4.4. Limitaciones del estudio

A pesar de la solidez metodológica y la integración histomolecular aplicada en esta investigación, es importante reconocer ciertas limitaciones inherentes al diseño y alcance del estudio que pueden influir en la interpretación y generalización de los resultados obtenidos.

1. Carácter retrospectivo y tamaño limitado de la cohorte: el estudio fue diseñado con una metodología retrospectiva, utilizando muestras históricas incluidas en parafina de archivos anatomopatológicos y registros clínicos de pacientes diagnosticados entre los años 2005 y 2017. Si bien esto permitió acceder a una cohorte relevante de 119 casos, el diseño no prospectivo implica posibles sesgos de selección, pérdida de datos clínicos o tratamientos heterogéneos entre pacientes. Asimismo, el tamaño de la muestra, aunque suficiente para

la identificación de asociaciones significativas en algunas variables, limita el poder estadístico para subgrupos específicos, en especial aquellos con baja frecuencia de alteraciones como, por ejemplo, las deleciones de NFKBIA o TP53. Esto podría subestimar el impacto clínico de ciertos biomarcadores.

2. Ausencia de análisis funcional de las alteraciones encontradas: el enfoque del presente trabajo se centró en la detección estructural de alteraciones genéticas y epigenéticas mediante técnicas como MLPA, IHQ y secuenciación Sanger. No obstante, no se realizaron estudios funcionales complementarios que permitan validar el impacto biológico real de las variantes detectadas como, por ejemplo, cuantificación de expresión génica/proteica, ensayos de actividad enzimática, estudios in vitro o modelos celulares. Esta limitación impide discriminar con certeza si todas las alteraciones observadas poseen un rol oncogénico activo o si representan eventos pasajeros sin consecuencias funcionales (*passenger mutations*).
3. Incapacidad práctica de estudiar biopsias seriadas: para nuestro estudio se seleccionaron biopsias que fueron realizadas para establecer el diagnóstico definitivo de tumor glial ante la existencia de lesión intracraneal sospechosa identificada en estudios de imagen (Resonancia Magnética o Tomografía). Si bien la cantidad y calidad de la muestra fue estrictamente considerada previo al análisis molecular exhaustivo, la biopsia ofrece una visión estática en la dinámica evolución tumoral. Nuevos enfoques podrán en un futuro cercano permitir superar estas limitaciones, como la obtención de biopsias a partir del marcado de zonas hipermetabólicas o con mayor grado de angiogénesis del tumor o el análisis del ADN tumoral circulante en el líquido cefalorraquídeo (biopsia líquida) que permita capturar la heterogeneidad espacial del tumor y monitorizar la evolución temporal del tumor de forma mínimamente invasiva.
4. Falta de evaluación de otros biomarcadores emergentes: A pesar del enfoque integral aplicado, no se estudiaron algunos biomarcadores moleculares que han demostrado relevancia diagnóstica, pronóstica o terapéutica en gliomas los que fueron incluidos en recomendaciones posteriores del Consorcio para Informar Enfoques Moleculares y Prácticos para la Taxonomía de Tumores del SNC (cIMPACT-NOW) que guiaron a la OMS a publicar una nueva actualización de la clasificación de gliomas en 2021 [143].

4.5. Perspectivas futuras

A partir de las limitaciones mencionadas y del avance continuo en el campo de la biología molecular tumoral, emergen nuevas líneas de investigación y mejora metodológica que podrían fortalecer los hallazgos obtenidos y abrir nuevas posibilidades clínicas.

A principios del 2017, se crea el cIMPACT-NOW para proporcionar recomendaciones y aclaraciones de la edición 2016 de la Clasificación de Tumores del SNC de la OMS, con el fin de integrar rápidamente los nuevos descubrimientos moleculares en la práctica diagnóstica y acompañar la evolución hacia una clasificación de tumores del SNC más molecular [144]. Los cambios clave propuestos para el estudio de gliomas en adultos se resumen en:

- división principal por estado IDH: los gliomas se dividen primero en IDHmut e IDHwt.
- grado definido por genética e histología: El grado (2, 3 o 4) ya no depende solo de la histología, sino de un conjunto de criterios que incluyen mutaciones específicas.
- el término glioblastoma: se reserva para tumores IDHwt con características histológicas y/o moleculares de alto grado (grado 4).

La mayoría de las recomendaciones publicadas por cIMPACT-NOW se incorporaron de forma oficial, en 2021, en la 5ª edición de la Clasificación de la OMS de Tumores del SNC, estableciendo que:

- un astrocitoma difuso IDHmut debe ser clasificado como grado 4 si presenta cualquiera de estas 3 características histológicas:
 - i) necrosis microvascular o en pseudoempalizada,
 - ii) mitosis elevadas (≥ 2.2 mitosis/mm²) o
 - iii) mutación en el gen TERT.
- en el astrocitoma difuso IDHmut, la delección homocigota de los genes CDKN2A/B es un marcador molecular de peor pronóstico y, en combinación con otros hallazgos, es suficiente para elevar el tumor a grado 4.
- se reemplaza el nombre de glioblastoma IDHmut por el de Astrocitoma Difuso IDHmut grado 4, y reservando la denominación de glioblastoma a aquellos tumores astrocíticos IDHwt de alto grado (grado 4).
- un tumor astrocítico IDHwt de bajo grado (grado 2 o 3) será nombrado glioblastoma (grado 4) si presenta alguna de las siguientes alteraciones moleculares definitivas [145]:
 - i) amplificación de EGFR,
 - ii) mutación en el promotor del gen TERT, o

iii) ganancia del cromosoma 7 combinada con pérdida del cromosoma 10 (+7/-10).

Cuando analizamos nuestra cohorte, con los nuevos parámetros se observó el cambio de clasificación en 7 tumores pronosticando un comportamiento más agresivo:

- 6 *astrocitomas anaplásico IDHwt* (Glio04, H09, H30, H31, H45, H48) que presentaron amplificación en el gen EGFR se reclasifican como glioblastomas.
- 1 *astrocitoma anaplásico IDHmut* (H20) con delección en los genes CDKN2A/B se clasifica como astrocitoma IDHmut grado 4.

Será fundamental ampliar el panel de estudio hacia biomarcadores reconocidos por la clasificación OMS más reciente, como las alteraciones en los genes TERT, ATRX, H3K27M y otros reguladores epigenéticos. Asimismo, la evaluación sistemática del estado de metilación global del genoma tumoral (*fenotipo G-CIMP*) podría contribuir a refinar la clasificación pronóstica, particularmente en gliomas IDHmut.

La utilización de plataformas de secuenciación masiva permitiría detectar de forma simultánea alteraciones moleculares en múltiples genes con mayor sensibilidad y cobertura que las técnicas convencionales y pudiendo facilitar el análisis de cambios génicos de baja frecuencia, útiles para seleccionar terapias dirigidas emergentes.

Finalmente, es imprescindible validar los resultados obtenidos en series independientes de pacientes, idealmente mediante estudios multicéntricos con mayor diversidad geográfica, étnica y clínica. Esta validación externa aseguraría la reproducibilidad de los biomarcadores propuestos y permitiría consolidar su utilidad pronóstica o predictiva en contextos clínicos diversos. Asimismo, podría facilitar el diseño de algoritmos diagnósticos estandarizados para su implementación en centros oncológicos de referencia.

5. CONCLUSIÓN

Este trabajo de tesis evidencia que la introducción de biomarcadores moleculares en el diagnóstico de los gliomas representa un cambio de paradigma en la neuro oncología, marcando la transición definitiva de una clasificación puramente morfológica a una **taxonomía integrada histomolecular**. Este trabajo ha puesto de manifiesto su impacto actual para el diagnóstico y el pronóstico de la enfermedad, y en un futuro cercano en la terapéutica con la introducción de nuevos fármacos.

La caracterización molecular ha permitido desentrañar la heterogeneidad biológica que se ocultaba tras similitudes histológicas. Bajo términos genéricos como astrocitoma anaplásico o glioblastoma se revela hoy como un conjunto de entidades distintas mediante la detección de alteraciones moleculares como el estado mutacional de los genes IDH1 e IDH2, la CD-1p/19q, las alteraciones en los genes EGFR o CDKN2A/B, entre otras. La **patología molecular** en el manejo clínico rutinario confiere una precisión diagnóstica sin precedentes, sentando las bases de una medicina oncológica moderna, donde el nombre del tumor aporte información sobre su comportamiento esperado.

Además, hemos podido evidenciar en esta tesis que este nuevo nivel de diagnóstico permite una capacidad pronóstica y predictiva radicalmente mejorada. Biomarcadores como el estado de metilación del pMGMT guía la selección de la quimioterapia de primera línea, optimizando la eficacia del tratamiento y evitando toxicidades innecesarias en aquellos pacientes con baja probabilidad de respuesta.

El análisis de alteraciones moleculares adicionales implicadas en la desregulación de las vías oncogénicas de la gliomagénesis, como la delección de PTEN, la metilación del pMGMT y las alteraciones en PDGFRA, demostró poseer un valor pronóstico independiente en la cohorte estudiada, consolidando su papel como biomarcadores complementarios en la estratificación de la enfermedad. Más allá de su implicación diagnóstica, la identificación de nuevas dianas moleculares abre una perspectiva traslacional directa, orientando el desarrollo de terapias dirigidas. Entre estas, destacan el uso de inhibidores de CDK4/6, antagonistas de receptores tirosina quinasa (EGFR/PDGFR), moduladores de microRNAs y bloqueantes de la vía de NF- κ B, cuyo potencial terapéutico podría personalizar el manejo de subgrupos específicos de pacientes en un futuro cercano.

En definitiva, la integración de los biomarcadores moleculares ha trascendido el ámbito del diagnóstico para erigirse como el pilar fundamental de una neuro oncología de precisión. Esta aproximación no solo permite una estratificación de pacientes en grupos pronósticos más homogéneos, sino que sienta las bases para el diseño de ensayos clínicos más inteligentes y el desarrollo de terapias dirigidas. El resultado final es la materialización de un manejo terapéutico verdaderamente personalizado, que busca maximizar la eficacia del tratamiento y ofrecer a cada paciente la mejor oportunidad clínica posible.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] A. L. Cohen y H. Colman, "Glioma Biology and Molecular Markers", en *Current Understanding and Treatment of Gliomas*, J. Raizer y A. Parsa, Eds., en Cancer Treatment and Research., Cham: Springer International Publishing, 2015, pp. 15–30. doi: 10.1007/978-3-319-12048-5_2.
- [2] T. Komori, Y. Muragaki, y M. F. Chernov, "Pathology and Genetics of Gliomas", *Prog Neurol Surg*, vol. 31, pp. 1–37, 2018, doi: 10.1159/000466835.
- [3] D. N. Louis *et al.*, "The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system", *Acta Neuropathol*, vol. 114, núm. 2, pp. 97–109, ago. 2007, doi: 10.1007/s00401-007-0243-4.
- [4] D. N. Louis *et al.*, "The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary", *Neuro Oncol*, vol. 23, núm. 8, pp. 1231–1251, ago. 2021, doi: 10.1093/neuonc/noab106.
- [5] B. Malzkorn y G. Reifenberger, "Integrated diagnostics of diffuse astrocytic and oligodendroglial tumors", *Pathologe*, vol. 40, núm. Suppl 1, pp. 9–17, jun. 2019, doi: 10.1007/s00292-019-0581-8.
- [6] S. Kohsaka y S. Tanak, "Chemotherapeutic Agent for Glioma", en *Clinical Management and Evolving Novel Therapeutic Strategies for Patients with Brain Tumors*, T. Lichtor, Ed., InTech, 2013. doi: 10.5772/54353.
- [7] M. Weller *et al.*, "European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas", *Lancet Oncol*, vol. 18, núm. 6, pp. e315–e329, jun. 2017, doi: 10.1016/S1470-2045(17)30194-8.
- [8] J. Li, C. Di, A. K. Mattox, L. Wu, y D. C. Adamson, "The future role of personalized medicine in the treatment of glioblastoma multiforme", *Pharmgenomics Pers Med*, vol. 3, pp. 111–127, 2010, doi: 10.2147/PGPM.S6852.
- [9] S. Satish, M. Athavale, y P. S. Kharkar, "Targeted therapies for Glioblastoma multiforme (GBM): State-of-the-art and future prospects", *Drug Dev Res*, vol. 85, núm. 7, p. e22261, nov. 2024, doi: 10.1002/ddr.22261.
- [10] Cancer Genome Atlas Research Network *et al.*, "Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas", *N Engl J Med*, vol. 372, núm. 26, pp. 2481–2498, jun. 2015, doi: 10.1056/NEJMoa1402121.
- [11] S. Hofer y A. B. Lassman, "Molecular markers in gliomas: impact for the clinician", *Target Oncol*, vol. 5, núm. 3, pp. 201–210, sep. 2010, doi: 10.1007/s11523-010-0157-2.
- [12] P. Śledzińska, M. G. Bebyn, J. Furtak, J. Kowalewski, y M. A. Lewandowska, "Prognostic and Predictive Biomarkers in Gliomas", *Int J Mol Sci*, vol. 22, núm. 19, p. 10373, sep. 2021, doi: 10.3390/ijms221910373.
- [13] H. Sareen, Y. Ma, T. M. Becker, T. L. Roberts, P. de Souza, y B. Powter, "Molecular Biomarkers in Glioblastoma: A Systematic Review and Meta-Analysis", *Int J Mol Sci*, vol. 23, núm. 16, p. 8835, ago. 2022, doi: 10.3390/ijms23168835.
- [14] S. M. Lee, H.-J. Koh, D.-C. Park, B. J. Song, T.-L. Huh, y J.-W. Park, "Cytosolic NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase status modulates oxidative damage to cells", *Free Radic Biol Med*, vol. 32, núm. 11, pp. 1185–1196, jun. 2002, doi: 10.1016/s0891-5849(02)00815-8.
- [15] N. Raimundo, B. E. Baysal, y G. S. Shadel, "Revisiting the TCA cycle: signaling to tumor formation", *Trends Mol Med*, vol. 17, núm. 11, pp. 641–649, nov. 2011, doi: 10.1016/j.molmed.2011.06.001.

- [16] D. W. Parsons *et al.*, “An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme”, *Science*, vol. 321, núm. 5897, pp. 1807–1812, sep. 2008, doi: 10.1126/science.1164382.
- [17] J. Balss, J. Meyer, W. Mueller, A. Korshunov, C. Hartmann, y A. von Deimling, “Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors”, *Acta Neuropathol*, vol. 116, núm. 6, pp. 597–602, dic. 2008, doi: 10.1007/s00401-008-0455-2.
- [18] C. Hartmann *et al.*, “Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas”, núm. 1432–0533 (Electronic).
- [19] A. L. Cohen, S. L. Holmen, y H. Colman, “IDH1 and IDH2 mutations in gliomas”, *Curr Neurol Neurosci Rep*, vol. 13, núm. 5, p. 345, may 2013, doi: 10.1007/s11910-013-0345-4.
- [20] H. Yan *et al.*, “IDH1 and IDH2 mutations in gliomas”, *N Engl J Med*, vol. 360, núm. 8, pp. 765–773, feb. 2009, doi: 10.1056/NEJMoa0808710.
- [21] C. W. Brennan *et al.*, “The somatic genomic landscape of glioblastoma”, *Cell*, vol. 155, núm. 2, pp. 462–477, oct. 2013, doi: 10.1016/j.cell.2013.09.034.
- [22] D. Avellaneda Matteo *et al.*, “Molecular mechanisms of isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) mutations identified in tumors: The role of size and hydrophobicity at residue 132 on catalytic efficiency”, *J Biol Chem*, vol. 292, núm. 19, pp. 7971–7983, may 2017, doi: 10.1074/jbc.M117.776179.
- [23] L. Dang *et al.*, “Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate”, *Nature*, vol. 462, núm. 7274, pp. 739–744, dic. 2009, doi: 10.1038/nature08617.
- [24] W. Xu *et al.*, “Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases”, *Cancer Cell*, vol. 19, núm. 1, pp. 17–30, ene. 2011, doi: 10.1016/j.ccr.2010.12.014.
- [25] R. Chowdhury *et al.*, “The oncometabolite 2-hydroxyglutarate inhibits histone lysine demethylases”, *EMBO Rep*, vol. 12, núm. 5, pp. 463–469, may 2011, doi: 10.1038/embor.2011.43.
- [26] L. Xia *et al.*, “Prognostic role of IDH mutations in gliomas: a meta-analysis of 55 observational studies”, *Oncotarget*, vol. 6, núm. 19, pp. 17354–17365, jul. 2015, doi: 10.18632/oncotarget.4008.
- [27] K. A. Jaeckle, “Oligodendroglial tumors”, *Semin Oncol*, vol. 41, núm. 4, pp. 468–477, ago. 2014, doi: 10.1053/j.seminoncol.2014.06.009.
- [28] S. Ohba y Y. Hirose, “Biological Significance of Mutant Isocitrate Dehydrogenase 1 and 2 in Gliomagenesis”, *Neurol Med Chir (Tokyo)*, vol. 56, núm. 4, pp. 170–179, 2016, doi: 10.2176/nmc.ra.2015-0322.
- [29] M. B. Pinkham, N. Telford, G. A. Whitfield, R. J. Colaco, F. O’Neill, y C. A. McBain, “FISHing Tips: What Every Clinician Should Know About 1p19q Analysis in Gliomas Using Fluorescence in situ Hybridisation”, *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, vol. 27, núm. 8, pp. 445–453, ago. 2015, doi: 10.1016/j.clon.2015.04.008.
- [30] M. S. Waitkus, B. H. Diplas, y H. Yan, “Isocitrate dehydrogenase mutations in gliomas”, *Neuro Oncol*, vol. 18, núm. 1, pp. 16–26, ene. 2016, doi: 10.1093/neuonc/nov136.
- [31] Y. Jiao *et al.*, “Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas”, *Oncotarget*, vol. 3, núm. 7, pp. 709–722, jul. 2012, doi: 10.18632/oncotarget.588.
- [32] C. L. Appin y D. J. Brat, “Biomarker-driven diagnosis of diffuse gliomas”, *Mol Aspects Med*, vol. 45, pp. 87–96, nov. 2015, doi: 10.1016/j.mam.2015.05.002.

- [33] J. E. Eckel-Passow *et al.*, “Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors”, *N Engl J Med*, vol. 372, núm. 26, pp. 2499–2508, jun. 2015, doi: 10.1056/NEJMoa1407279.
- [34] H. J. Kim, J. W. Park, y J. H. Lee, “Genetic Architectures and Cell-of-Origin in Glioblastoma”, *Front Oncol*, vol. 10, p. 615400, ene. 2021, doi: 10.3389/fonc.2020.615400.
- [35] D. N. Louis *et al.*, “The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary”, *Acta Neuropathol*, vol. 131, núm. 6, pp. 803–820, jun. 2016, doi: 10.1007/s00401-016-1545-1.
- [36] R. Stupp *et al.*, “Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma”, *N Engl J Med*, vol. 352, núm. 10, pp. 987–996, mar. 2005, doi: 10.1056/NEJMoa043330.
- [37] R. Stupp *et al.*, “Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial”, *Lancet Oncol*, vol. 10, núm. 5, pp. 459–466, may 2009, doi: 10.1016/S1470-2045(09)70025-7.
- [38] H. Strobel *et al.*, “Temozolomide and Other Alkylating Agents in Glioblastoma Therapy”, *Biomedicines*, vol. 7, núm. 3, p. 69, sep. 2019, doi: 10.3390/biomedicines7030069.
- [39] H. S. Friedman, T. Kerby, y H. Calvert, “Temozolomide and treatment of malignant glioma”, *Clin Cancer Res*, vol. 6, núm. 7, pp. 2585–2597, jul. 2000.
- [40] S. Hombach-Klonisch *et al.*, “Glioblastoma and chemoresistance to alkylating agents: Involvement of apoptosis, autophagy, and unfolded protein response”, *Pharmacol Ther*, vol. 184, pp. 13–41, abr. 2018, doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.10.017.
- [41] N. Mojas, M. Lopes, y J. Jiricny, “Mismatch repair-dependent processing of methylation damage gives rise to persistent single-stranded gaps in newly replicated DNA”, *Genes Dev*, vol. 21, núm. 24, pp. 3342–3355, dic. 2007, doi: 10.1101/gad.455407.
- [42] S. Brandner *et al.*, “MGMT promoter methylation testing to predict overall survival in people with glioblastoma treated with temozolomide: a comprehensive meta-analysis based on a Cochrane Systematic Review”, *Neuro Oncol*, vol. 23, núm. 9, pp. 1457–1469, sep. 2021, doi: 10.1093/neuonc/noab105.
- [43] T. C. G. A. R. Network, “Corrigendum: Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways”, *Nature*, vol. 494, núm. 7438, p. 506, feb. 2013, doi: 10.1038/nature11903.
- [44] M. Nakada *et al.*, “Aberrant signaling pathways in glioma”, *Cancers (Basel)*, vol. 3, núm. 3, pp. 3242–3278, ago. 2011, doi: 10.3390/cancers3033242.
- [45] Z. Zhao *et al.*, “Chinese Glioma Genome Atlas (CGGA): A Comprehensive Resource with Functional Genomic Data from Chinese Glioma Patients”, *Genomics Proteomics Bioinformatics*, vol. 19, núm. 1, pp. 1–12, feb. 2021, doi: 10.1016/j.gpb.2020.10.005.
- [46] K. Tomczak, P. Czerwińska, y M. Wiznerowicz, “The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge”, *Contemp Oncol (Pozn)*, vol. 19, núm. 1A, pp. A68–A77, 2015, doi: 10.5114/wo.2014.47136.
- [47] Cancer Genome Atlas Research Network, “Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways”, *Nature*, vol. 455, núm. 7216, pp. 1061–1068, oct. 2008, doi: 10.1038/nature07385.
- [48] J. Esteban-Villarrubia *et al.*, “Tyrosine Kinase Receptors in Oncology”, *Int J Mol Sci*, vol. 21, núm. 22, p. 8529, nov. 2020, doi: 10.3390/ijms21228529.

- [49] J. H. Sherman, A. Bobak, T. Arsiwala, P. Lockman, y S. Aulakh, "Targeting drug resistance in glioblastoma (Review)", *Int J Oncol*, vol. 65, núm. 2, p. 80, ago. 2024, doi: 10.3892/ijo.2024.5668.
- [50] M. Tilak, J. Holborn, L. A. New, J. Lalonde, y N. Jones, "Receptor Tyrosine Kinase Signaling and Targeting in Glioblastoma Multiforme", *Int J Mol Sci*, vol. 22, núm. 4, p. 1831, feb. 2021, doi: 10.3390/ijms22041831.
- [51] N. J. Szerlip *et al.*, "Intratumoral heterogeneity of receptor tyrosine kinases EGFR and PDGFRA amplification in glioblastoma defines subpopulations with distinct growth factor response", *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 109, núm. 8, pp. 3041–3046, feb. 2012, doi: 10.1073/pnas.1114033109.
- [52] D. E. Heppner y M. J. Eck, "A structural perspective on targeting the RTK/Ras/MAP kinase pathway in cancer", *Protein Sci*, vol. 30, núm. 8, pp. 1535–1553, ago. 2021, doi: 10.1002/pro.4125.
- [53] M. Iida, P. M. Harari, D. L. Wheeler, y M. Toulany, "Targeting AKT/PKB to improve treatment outcomes for solid tumors", *Mutat Res*, vol. 819–820, p. 111690, 2020, doi: 10.1016/j.mrfmmm.2020.111690.
- [54] M. Hashemi *et al.*, "Progress in targeting PTEN/PI3K/Akt axis in glioblastoma therapy: Revisiting molecular interactions", *Biomed Pharmacother*, vol. 158, p. 114204, feb. 2023, doi: 10.1016/j.biopha.2022.114204.
- [55] S. Keller y M. H. H. Schmidt, "EGFR and EGFRvIII Promote Angiogenesis and Cell Invasion in Glioblastoma: Combination Therapies for an Effective Treatment", *Int J Mol Sci*, vol. 18, núm. 6, p. 1295, jun. 2017, doi: 10.3390/ijms18061295.
- [56] R. Costa *et al.*, "FGFR3-TACC3 fusion in solid tumors: mini review", *Oncotarget*, vol. 7, núm. 34, pp. 55924–55938, ago. 2016, doi: 10.18632/oncotarget.10482.
- [57] A. Alentorn *et al.*, "Prevalence, clinico-pathological value, and co-occurrence of PDGFRA abnormalities in diffuse gliomas", *Neuro Oncol*, vol. 14, núm. 11, pp. 1393–1403, nov. 2012, doi: 10.1093/neuonc/nos217.
- [58] A. Jimenez-Pascual y F. A. Siebzehnrbul, "Fibroblast Growth Factor Receptor Functions in Glioblastoma", *Cells*, vol. 8, núm. 7, p. 715, jul. 2019, doi: 10.3390/cells8070715.
- [59] L. Du *et al.*, "Research progress on the role of PTEN deletion or mutation in the immune microenvironment of glioblastoma", *Front Oncol*, vol. 14, p. 1409519, 2024, doi: 10.3389/fonc.2024.1409519.
- [60] V. Álvarez-García, Y. Tawil, H. M. Wise, y N. R. Leslie, "Mechanisms of PTEN loss in cancer: It's all about diversity", *Semin Cancer Biol*, vol. 59, pp. 66–79, dic. 2019, doi: 10.1016/j.semcancer.2019.02.001.
- [61] J. Shen, Q. Wang, Y. Mao, W. Gao, y S. Duan, "Targeting the p53 signaling pathway in cancers: Molecular mechanisms and clinical studies", *MedComm (2020)*, vol. 4, núm. 3, p. e288, jun. 2023, doi: 10.1002/mco2.288.
- [62] A. Shergalis, A. Bankhead, U. Luesakul, N. Muangsinsin, y N. Neamati, "Current Challenges and Opportunities in Treating Glioblastoma", *Pharmacol Rev*, vol. 70, núm. 3, pp. 412–445, jul. 2018, doi: 10.1124/pr.117.014944.
- [63] M. Youssef, J. Mandel, S. Chowdhary, y S. Kesari, "Recent Advances for Targeted Therapies in Glioblastoma.", en *Advances in Biology and Treatment of Glioblastoma*.
- [64] Y. Zhang *et al.*, "The p53 Pathway in Glioblastoma", *Cancers (Basel)*, vol. 10, núm. 9, p. 297, sep. 2018, doi: 10.3390/cancers10090297.

- [65] S. Venkatesan, M. L. M. Lamfers, C. M. F. Dirven, y S. Leenstra, "Genetic biomarkers of drug response for small-molecule therapeutics targeting the RTK/Ras/PI3K, p53 or Rb pathway in glioblastoma", *CNS Oncol*, vol. 5, núm. 2, pp. 77–90, 2016, doi: 10.2217/cns-2015-0005.
- [66] Y. Zhou *et al.*, "Expanding Roles of the E2F-RB-p53 Pathway in Tumor Suppression", *Biology (Basel)*, vol. 12, núm. 12, p. 1511, dic. 2023, doi: 10.3390/biology12121511.
- [67] R. Appay *et al.*, "CDKN2A homozygous deletion is a strong adverse prognosis factor in diffuse malignant IDH-mutant gliomas", *Neuro Oncol*, vol. 21, núm. 12, pp. 1519–1528, dic. 2019, doi: 10.1093/neuonc/noz124.
- [68] M. Gallo, "Prognostic value of integrative genomic approaches for IDH-mutant gliomas", *Neuro Oncol*, vol. 25, núm. 11, pp. 2042–2043, nov. 2023, doi: 10.1093/neuonc/noad151.
- [69] X. Chen *et al.*, "Clinical prognostic value of isocitrate dehydrogenase mutation, O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation, and 1p19q co-deletion in glioma patients", *Ann Transl Med*, vol. 7, núm. 20, p. 541, oct. 2019, doi: 10.21037/atm.2019.09.126.
- [70] A. Squalli Houssaini *et al.*, "Prognostic Value of ATRX and p53 Status in High-Grade Glioma Patients in Morocco", *Cureus*, vol. 16, núm. 3, p. e56361, mar. 2024, doi: 10.7759/cureus.56361.
- [71] W. Haque, E. Thong, S. Andrabi, V. Verma, E. Brian Butler, y B. S. Teh, "Prognostic and predictive impact of MGMT promoter methylation in grade 3 gliomas", *J Clin Neurosci*, vol. 85, pp. 115–121, mar. 2021, doi: 10.1016/j.jocn.2020.12.028.
- [72] R. I. Skotheim, C. B. Diep, S. M. Kraggerud, K. S. Jakobsen, y R. A. Lothe, "Evaluation of loss of heterozygosity/allelic imbalance scoring in tumor DNA", *Cancer Genet Cytogenet*, vol. 127, núm. 1, pp. 64–70, may 2001, doi: 10.1016/s0165-4608(00)00433-7.
- [73] M. Thotakura, N. Tirumalasetti, y R. Krishna, "Role of Ki-67 labeling index as an adjunct to the histopathological diagnosis and grading of astrocytomas", *J Cancer Res Ther*, vol. 10, núm. 3, pp. 641–645, 2014, doi: 10.4103/0973-1482.139154.
- [74] A. Alkhaibary, A. H. Alassiri, F. AlSufiani, y M. A. Alharbi, "Ki-67 labeling index in glioblastoma; does it really matter?", *Hematol Oncol Stem Cell Ther*, vol. 12, núm. 2, pp. 82–88, jun. 2019, doi: 10.1016/j.hemonc.2018.11.001.
- [75] J. V. van Asperen, D. M. Fedorushkova, P. A. J. T. Robe, y E. M. Hol, "Investigation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in body fluids as a potential biomarker for glioma: a systematic review and meta-analysis", *Biomarkers*, vol. 27, núm. 1, pp. 1–12, feb. 2022, doi: 10.1080/1354750X.2021.2006313.
- [76] R. Poyuran, K. Chandrasekharan, H. V. Easwer, y D. Narasimhaiah, "Glioblastoma with primitive neuronal component: An immunohistochemical study and review of literature", *J Clin Neurosci*, vol. 93, pp. 130–136, nov. 2021, doi: 10.1016/j.jocn.2021.09.004.
- [77] Y. Tanaka, S. Nobusawa, S. Yagi, H. Ikota, H. Yokoo, y Y. Nakazato, "Anaplastic oligodendroglioma with ganglioglioma-like maturation", *Brain Tumor Pathol*, vol. 29, núm. 4, pp. 221–228, oct. 2012, doi: 10.1007/s10014-011-0078-5.
- [78] A. Yoshida *et al.*, "Frequent false-negative immunohistochemical staining with IDH1 (R132H)-specific H09 antibody on frozen section control slides: a potential pitfall in glioma diagnosis", *Histopathology*, vol. 74, núm. 2, pp. 350–354, ene. 2019, doi: 10.1111/his.13756.
- [79] Y. Kato, "Specific monoclonal antibodies against IDH1/2 mutations as diagnostic tools for gliomas", *Brain Tumor Pathol*, vol. 32, núm. 1, pp. 3–11, ene. 2015, doi: 10.1007/s10014-014-0202-4.
- [80] J.-H. Hung y Z. Weng, "Designing Polymerase Chain Reaction Primers Using Primer3Plus", *Cold Spring Harb Protoc*, vol. 2016, núm. 9, sep. 2016, doi: 10.1101/pdb.prot093096.

- [81] J. Ye, G. Coulouris, I. Zaretskaya, I. Cutcutache, S. Rozen, y T. L. Madden, "Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction", *BMC Bioinformatics*, vol. 13, p. 134, jun. 2012, doi: 10.1186/1471-2105-13-134.
- [82] T. A. Hall, "BIOEDIT: A USER-FRIENDLY BIOLOGICAL SEQUENCE ALIGNMENT EDITOR AND ANALYSIS PROGRAM FOR WINDOWS 95/98/ NT", 1999. [En línea]. Disponible en: <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:82421255>
- [83] C. Hömig-Hölzel y S. Savola, "Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) in tumor diagnostics and prognostics", *Diagn Mol Pathol*, vol. 21, núm. 4, pp. 189–206, dic. 2012, doi: 10.1097/PDM.0b013e3182595516.
- [84] X. Fu *et al.*, "Advances of multiplex ligation-dependent probe amplification technology in molecular diagnostics", *Biotechniques*, vol. 73, núm. 4, pp. 205–213, oct. 2022, doi: 10.2144/btn-2022-0017.
- [85] C. B. Moelans, L. Atanesyan, S. P. Savola, y P. J. van Diest, "Methylation-Specific Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MS-MLPA)", *Methods Mol Biol*, vol. 1708, pp. 537–549, 2018, doi: 10.1007/978-1-4939-7481-8_27.
- [86] M. K. Goel, P. Khanna, y J. Kishore, "Understanding survival analysis: Kaplan-Meier estimate", *Int J Ayurveda Res*, vol. 1, núm. 4, pp. 274–278, oct. 2010, doi: 10.4103/0974-7788.76794.
- [87] J. P. Klein y M. L. Moeschberger, "Multivariate Survival Analysis", en *Survival Analysis: Techniques for Censored and Truncated Data*, J. P. Klein y M. L. Moeschberger, Eds., New York, NY: Springer, 2003, pp. 425–441. doi: 10.1007/0-387-21645-6_13.
- [88] "Statistics with Confidence: Confidence Intervals and Statistical Guidelines, 2nd Edition | Wiley", Wiley.com. Consultado: el 2 de Octubre de 2025. [En línea]. Disponible en: <https://www.wiley.com/en-gb/Statistics+with+Confidence%3A+Confidence+Intervals+and+Statistical+Guidelines%2C+2nd+Edition-p-9780727913753>
- [89] A. Kakkar *et al.*, "Loss of heterozygosity on chromosome 10q in glioblastomas, and its association with other genetic alterations and survival in Indian patients", *Neurol India*, vol. 59, núm. 2, pp. 254–261, 2011, doi: 10.4103/0028-3886.79139.
- [90] H. Wikman *et al.*, "Relevance of PTEN loss in brain metastasis formation in breast cancer patients", *Breast Cancer Res*, vol. 14, núm. 2, p. R49, mar. 2012, doi: 10.1186/bcr3150.
- [91] V. Álvarez-García, Y. Tawil, H. M. Wise, y N. R. Leslie, "Mechanisms of PTEN loss in cancer: It's all about diversity", *Semin Cancer Biol*, vol. 59, pp. 66–79, dic. 2019, doi: 10.1016/j.semcancer.2019.02.001.
- [92] M. Yoshimoto *et al.*, "Use of multicolor fluorescence in situ hybridization to detect deletions in clinical tissue sections", *Lab Invest*, vol. 98, núm. 4, pp. 403–413, abr. 2018, doi: 10.1038/s41374-017-0007-2.
- [93] N. Zainuddin, H. Jaafart, M. N. Isa, y J. M. Abdullah, "Loss of heterozygosity on chromosomes 10q, 9p, 17p and 13q in malays with malignant glioma", *Neurol Res*, vol. 26, núm. 1, pp. 88–92, ene. 2004, doi: 10.1179/016164104773026598.
- [94] T. Mitsudomi y Y. Yatabe, "Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer", *FEBS J*, vol. 277, núm. 2, pp. 301–308, ene. 2010, doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07448.x.
- [95] K. J. Hatanpaa, S. Burma, D. Zhao, y A. A. Habib, "Epidermal growth factor receptor in glioma: signal transduction, neuropathology, imaging, and radioresistance", *Neoplasia*, vol. 12, núm. 9, pp. 675–684, sep. 2010, doi: 10.1593/neo.10688.

- [96] H. K. Gan, A. N. Cvrljevic, y T. G. Johns, "The epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII): where wild things are altered", *FEBS J*, vol. 280, núm. 21, pp. 5350–5370, nov. 2013, doi: 10.1111/febs.12393.
- [97] J. Jeuken *et al.*, "Robust detection of EGFR copy number changes and EGFR variant III: technical aspects and relevance for glioma diagnostics", *Brain Pathol*, vol. 19, núm. 4, pp. 661–671, oct. 2009, doi: 10.1111/j.1750-3639.2009.00320.x.
- [98] C. L. Appin y D. J. Brat, "Biomarker-driven diagnosis of diffuse gliomas", *Mol Aspects Med*, vol. 45, pp. 87–96, nov. 2015, doi: 10.1016/j.mam.2015.05.002.
- [99] Y. Kotake, M. Naemura, C. Murasaki, Y. Inoue, y H. Okamoto, "Transcriptional Regulation of the p16 Tumor Suppressor Gene", *Anticancer Res*, vol. 35, núm. 8, pp. 4397–4401, ago. 2015.
- [100] E. Guérit, F. Arts, G. Dachy, B. Boulouadnine, y J.-B. Demoulin, "PDGF receptor mutations in human diseases", *Cell Mol Life Sci*, vol. 78, núm. 8, pp. 3867–3881, abr. 2021, doi: 10.1007/s00018-020-03753-y.
- [101] C. L. Appin y D. J. Brat, "Molecular genetics of gliomas", *Cancer J*, vol. 20, núm. 1, pp. 66–72, 2014, doi: 10.1097/PPO.000000000000020.
- [102] A. Sriraman, A. Dickmanns, Z. Najafova, S. A. Johnsen, y M. Dobbstein, "CDK4 inhibition diminishes p53 activation by MDM2 antagonists", *Cell Death Dis*, vol. 9, núm. 9, p. 918, sep. 2018, doi: 10.1038/s41419-018-0968-0.
- [103] H. Kim, W. Huang, X. Jiang, B. Pennicooke, P. J. Park, y M. D. Johnson, "Integrative genome analysis reveals an oncomir/oncogene cluster regulating glioblastoma survivorship", *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 107, núm. 5, pp. 2183–2188, feb. 2010, doi: 10.1073/pnas.0909896107.
- [104] Q. Li y I. M. Verma, "NF-kappaB regulation in the immune system", *Nat Rev Immunol*, vol. 2, núm. 10, pp. 725–734, oct. 2002, doi: 10.1038/nri910.
- [105] A. Idbaih, Y. Marie, y M. Sanson, "NFKBIA deletion in glioblastomas", *N Engl J Med*, vol. 365, núm. 3, pp. 277; author reply 277–278, jul. 2011, doi: 10.1056/NEJMc1103354.
- [106] R. J. Komotar, R. M. Starke, E. S. Connolly, y M. B. Sisti, "Alteration in NFKBIA and EGFR in glioblastoma multiforme", *Neurosurgery*, vol. 68, núm. 6, pp. N14–15, jun. 2011, doi: 10.1227/01.neu.0000398206.71573.50.
- [107] M. Olivier, M. Hollstein, y P. Hainaut, "TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use", *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 2, núm. 1, p. a001008, ene. 2010, doi: 10.1101/cshperspect.a001008.
- [108] B. K. Rasheed *et al.*, "Alterations of the TP53 gene in human gliomas", *Cancer Res*, vol. 54, núm. 5, pp. 1324–1330, mar. 1994.
- [109] M. E. Davis, "Epidemiology and Overview of Gliomas", *Semin Oncol Nurs*, vol. 34, núm. 5, pp. 420–429, dic. 2018, doi: 10.1016/j.soncn.2018.10.001.
- [110] Q. T. Ostrom *et al.*, "CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2016–2020", *Neuro Oncol*, vol. 25, núm. 12 Suppl 2, pp. iv1–iv99, oct. 2023, doi: 10.1093/neuonc/noad149.
- [111] S. C. Thust *et al.*, "Glioma imaging in Europe: A survey of 220 centres and recommendations for best clinical practice", *Eur Radiol*, vol. 28, núm. 8, pp. 3306–3317, ago. 2018, doi: 10.1007/s00330-018-5314-5.
- [112] K. Donev, B. W. Scheithauer, F. J. Rodriguez, y S. Jenkins, "Expression of diagnostic neuronal markers and outcome in glioblastoma", *Neuropathol Appl Neurobiol*, vol. 36, núm. 5, pp. 411–421, ago. 2010, doi: 10.1111/j.1365-2990.2010.01078.x.

- [113] M. Preusser, A. Wöhrer, S. Stary, R. Höftberger, B. Streubel, y J. A. Hainfellner, "Value and limitations of immunohistochemistry and gene sequencing for detection of the IDH1-R132H mutation in diffuse glioma biopsy specimens", *J Neuropathol Exp Neurol*, vol. 70, núm. 8, pp. 715–723, ago. 2011, doi: 10.1097/NEN.0b013e31822713f0.
- [114] C. Hartmann *et al.*, "Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas", *Acta Neuropathol*, vol. 118, núm. 4, pp. 469–474, oct. 2009, doi: 10.1007/s00401-009-0561-9.
- [115] E. Tabouret *et al.*, "Prognostic impact of the 2016 WHO classification of diffuse gliomas in the French POLA cohort", *Acta Neuropathol*, vol. 132, núm. 4, pp. 625–634, oct. 2016, doi: 10.1007/s00401-016-1611-8.
- [116] T. Iuchi *et al.*, "Clinical significance of the 2016 WHO classification in Japanese patients with gliomas", *Brain Tumor Pathol*, vol. 35, núm. 2, pp. 71–80, abr. 2018, doi: 10.1007/s10014-018-0309-0.
- [117] F. Sahm *et al.*, "Farewell to oligoastrocytoma: in situ molecular genetics favor classification as either oligodendroglioma or astrocytoma", *Acta Neuropathol*, vol. 128, núm. 4, pp. 551–559, oct. 2014, doi: 10.1007/s00401-014-1326-7.
- [118] E. S. Lipp y R. E. McLendon, "Tissue is the Issue: Biomarkers of Prognosis and Classification in Adult Gliomas", *Semin Oncol Nurs*, vol. 34, núm. 5, pp. 430–442, dic. 2018, doi: 10.1016/j.soncn.2018.10.002.
- [119] D. Ye, S. Ma, Y. Xiong, y K.-L. Guan, "R-2-Hydroxyglutarate as the Key Effector of IDH Mutations Promoting Oncogenesis", *Cancer Cell*, vol. 23, núm. 3, pp. 274–276, mar. 2013, doi: 10.1016/j.ccr.2013.03.005.
- [120] G. Karpel-Massler, T. T. T. Nguyen, E. Shang, y M. D. Siegelin, "Novel IDH1-Targeted Glioma Therapies", *CNS Drugs*, vol. 33, núm. 12, pp. 1155–1166, dic. 2019, doi: 10.1007/s40263-019-00684-6.
- [121] C. V. Mojica, K. M. E. Gutierrez, y W. P. Mason, "Advances in IDH-mutant glioma management: IDH inhibitors, clinical implications of INDIGO trial, and future perspectives", *Future Oncol*, vol. 21, núm. 16, pp. 2089–2099, jul. 2025, doi: 10.1080/14796694.2025.2511587.
- [122] C. Kang, "Olutasidenib: First Approval", *Drugs*, vol. 83, núm. 4, pp. 341–346, mar. 2023, doi: 10.1007/s40265-023-01844-1.
- [123] Y. N. Lamb, "Vorasidenib: First Approval", *Drugs*, vol. 84, núm. 10, pp. 1325–1331, oct. 2024, doi: 10.1007/s40265-024-02097-2.
- [124] G. S. Stoyanov, D. L. Dzhenkov, M. Kitanova, I. S. Donev, y P. Ghenev, "Correlation Between Ki-67 Index, World Health Organization Grade and Patient Survival in Glial Tumors With Astrocytic Differentiation", *Cureus*, vol. 9, núm. 6, p. e1396, jun. 2017, doi: 10.7759/cureus.1396.
- [125] M. Weller *et al.*, "Molecular classification of diffuse cerebral WHO grade II/III gliomas using genome- and transcriptome-wide profiling improves stratification of prognostically distinct patient groups", *Acta Neuropathol*, vol. 129, núm. 5, pp. 679–693, may 2015, doi: 10.1007/s00401-015-1409-0.
- [126] M. M. Binabaj *et al.*, "The prognostic value of MGMT promoter methylation in glioblastoma: A meta-analysis of clinical trials", *J Cell Physiol*, vol. 233, núm. 1, pp. 378–386, ene. 2018, doi: 10.1002/jcp.25896.
- [127] S. Patnam *et al.*, "Exosomal PTEN as a Predictive Marker of Aggressive Gliomas", *Neurol India*, vol. 70, núm. 1, pp. 215–222, 2022, doi: 10.4103/0028-3886.338731.

- [128] F. S. Saadeh, R. Mahfouz, y H. I. Assi, "EGFR as a clinical marker in glioblastomas and other gliomas", *Int J Biol Markers*, vol. 33, núm. 1, pp. 22–32, ene. 2018, doi: 10.5301/ijbm.5000301.
- [129] Z. An *et al.*, "EGFR and EGFRvIII coopt host defense pathways promoting progression in glioblastoma", *Neuro Oncol*, vol. 27, núm. 2, pp. 383–397, feb. 2025, doi: 10.1093/neuonc/noae182.
- [130] M. Westphal, C. L. Maire, y K. Lamszus, "EGFR as a Target for Glioblastoma Treatment: An Unfulfilled Promise", *CNS Drugs*, vol. 31, núm. 9, pp. 723–735, sep. 2017, doi: 10.1007/s40263-017-0456-6.
- [131] X. Cui *et al.*, "Blockage of EGFR/AKT and mevalonate pathways synergize the antitumor effect of temozolomide by reprogramming energy metabolism in glioblastoma", *Cancer Commun (Lond)*, vol. 43, núm. 12, pp. 1326–1353, dic. 2023, doi: 10.1002/cac2.12502.
- [132] "First-in-class Brain-penetrant EGFR/EGFRvIII Inhibitor Against Gliomas", Protheragen. Consultado: el 5 de octubre de 2025. [En línea]. Disponible en: <https://www.protheragen.com/available-projects/first-in-class-brain-penetrant-egfr-egfrviii-inhibitor-against-gliomas/>
- [133] D. M. O'Rourke *et al.*, "A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma", *Sci Transl Med*, vol. 9, núm. 399, p. eaaa0984, jul. 2017, doi: 10.1126/scitranslmed.aaa0984.
- [134] S. P. Fortin Ensign, R. B. Jenkins, C. Giannini, J. N. Sarkaria, E. Galanis, y S. H. Kizilbash, "Translational significance of CDKN2A/B homozygous deletion in isocitrate dehydrogenase-mutant astrocytoma", *Neuro Oncol*, vol. 25, núm. 1, pp. 28–36, ene. 2023, doi: 10.1093/neuonc/noac205.
- [135] A. M. Nasser *et al.*, "CDKN2A/B Homozygous Deletion Sensitizes IDH-Mutant Glioma to CDK4/6 Inhibition", *Clin Cancer Res*, vol. 30, núm. 14, pp. 2996–3005, jul. 2024, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-24-0562.
- [136] G. J. Rahme *et al.*, "Modeling epigenetic lesions that cause gliomas", *Cell*, vol. 186, núm. 17, pp. 3674–3685.e14, ago. 2023, doi: 10.1016/j.cell.2023.06.022.
- [137] J. Zheng *et al.*, "lncRNA PVT1 promotes the angiogenesis of vascular endothelial cell by targeting miR-26b to activate CTGF/ANGPT2", *Int J Mol Med*, vol. 42, núm. 1, pp. 489–496, jul. 2018, doi: 10.3892/ijmm.2018.3595.
- [138] J. W. Taylor *et al.*, "Phase-2 trial of palbociclib in adult patients with recurrent RB1-positive glioblastoma", *J Neurooncol*, vol. 140, núm. 2, pp. 477–483, nov. 2018, doi: 10.1007/s11060-018-2977-3.
- [139] M. Bredel *et al.*, "NFKBIA deletion in glioblastomas", *N Engl J Med*, vol. 364, núm. 7, pp. 627–637, feb. 2011, doi: 10.1056/NEJMoa1006312.
- [140] R. J. Komotar, R. M. Starke, E. S. Connolly, y M. B. Sisti, "Alteration in NFKBIA and EGFR in glioblastoma multiforme", *Neurosurgery*, vol. 68, núm. 6, pp. N14–15, jun. 2011, doi: 10.1227/01.neu.0000398206.71573.50.
- [141] R. G. W. Verhaak *et al.*, "Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1", *Cancer Cell*, vol. 17, núm. 1, pp. 98–110, ene. 2010, doi: 10.1016/j.ccr.2009.12.020.
- [142] Cancer Genome Atlas Research Network *et al.*, "Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas", *N Engl J Med*, vol. 372, núm. 26, pp. 2481–2498, jun. 2015, doi: 10.1056/NEJMoa1402121.

- [143] D. N. Louis *et al.*, "The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary", *Neuro Oncol*, vol. 23, núm. 8, pp. 1231–1251, ago. 2021, doi: 10.1093/neuonc/noab106.
- [144] D. J. Brat *et al.*, "cIMPACT-NOW update 3: recommended diagnostic criteria for 'Diffuse astrocytic glioma, IDH-wildtype, with molecular features of glioblastoma, WHO grade IV'", *Acta Neuropathol*, vol. 136, núm. 5, pp. 805–810, nov. 2018, doi: 10.1007/s00401-018-1913-0.
- [145] M. M. J. Wijnenga *et al.*, "Molecular and clinical heterogeneity of adult diffuse low-grade IDH wild-type gliomas: assessment of TERT promoter mutation and chromosome 7 and 10 copy number status allows superior prognostic stratification", *Acta Neuropathol*, vol. 134, núm. 6, pp. 957–959, dic. 2017, doi: 10.1007/s00401-017-1781-z.