



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma  
de Barcelona

**Departamento de Ciencias Morfológicas  
Programa de doctorado en Morfología  
y Patología estructural y molecular**

**NUEVO ALGORITMO MOLECULAR PARA  
LA CLASIFICACIÓN DEL GLIOBLASTOMA:  
CORRELATO CON LOS PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA**

Memoria de tesis doctoral presentada por **Cristina Carrato Moñino** para optar al grado  
de **Doctora por la Universidad Autònoma de Barcelona**

Este trabajo se ha realizado en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Germans Trias i Pujol, bajo la dirección de los Dres. Aurelio Ariza Fernández (Servicio de Anatomía Patológica), M Carmen Balañá Quintero (Servicio de Oncología Médica) y Salvador Villà Freixa (Servicio de Oncología Radioterápica)

Doctoranda	Director	Codirector	Codirector
Cristina Carrato Moñino	Aurelio Ariza Fernández	M Carmen Balañá Quintero	Salvador Villà Freixa

Barcelona, abril 2017



Barcelona, 2017

El Dr. Aurelio Ariza Fernández, catedrático de la Unidad de Anatomía Patológica del Departamento de Ciencias Morfológicas de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona y Jefe de Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Germans Trias i Pujol

CERTIFICA:

Que Doña Cristina Carrato Moñino ha realizado bajo la dirección de los abajo firmantes el trabajo de investigación correspondiente a la tesis doctoral titulada:

**NUEVO ALGORITMO MOLECULAR PARA  
LA CLASIFICACIÓN DEL GLIOBLASTOMA:  
CORRELATO CON LOS PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA**

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

Dr. Aurelio Ariza Fernández  
Barcelona, abril 2017

Directores de la tesis:

Dr. Aurelio Ariza Fernández  
Dpto. Anatomía Patológica  
HUGTIP, Badalona, Barcelona

Dra. M Carmen Balañá Quintero  
Dpto. Oncología Médica  
ICO-Badalona, Barcelona

Dr. Salvador Villà Freixa  
Dpto. Oncología Radioterápica  
ICO-Badalona, Barcelona



*A José María y Mateo*  
*A mis padres, mi abuela y mi hermana*  
*A Aurelio, Eva y Maite*



*“Insanity: doing the same thing over and over again  
and expecting different results”*

Albert Einstein







<b>Índice</b> .....	<b>9</b>
Lista de abreviaturas: .....	15
<b>I. Introducción</b> .....	<b>19</b>
<b>I.1. Glioblastoma: características morfológicas y clínicas</b> .....	<b>21</b>
I.1.1. Definición y frecuencia del GB.....	21
I.1.2. Características histopatológicas del GB.....	23
I.1.3. Tipos de GB.....	25
I.1.3.1. GB primarios y secundarios: GB-IDHwt y GB-IDHm .....	25
I.1.3.2. Variantes y patrones histológicos de GB .....	26
I.1.3.2.1. GB de células gigantes .....	27
I.1.3.2.2. Gliosarcoma .....	27
I.1.3.2.3. GB epitelioides .....	28
I.1.3.2.4. Patrones de GB .....	29
I.1.3.2.5. Glioma difuso de la línea media con mutación H3 K27M .....	31
I.1.4. Características clínicas y radiológicas del GB .....	32
I.1.5. Pronóstico y tratamiento del GB .....	33
<b>I.2. Principales alteraciones moleculares en GB</b> .....	<b>35</b>
I.2.1. Principales alteraciones moleculares en el conjunto de los gliomas infiltrantes .....	36
I.2.1.1. Mutación de IDH .....	37
I.2.1.2. Mutación de ATRX.....	40
I.2.1.3. Mutación de TP53 .....	41
I.2.1.4. Codeleción de 1p/19q y mutaciones en CIC y FUBP1.....	42
I.2.2. Principales alteraciones moleculares más propias de los GB.....	43
I.2.2.1. Metilación del promotor de MGMT .....	43
I.2.2.2. Alteraciones en EGFR .....	45
I.2.2.3. Mutación del promotor de TERT .....	47
I.2.3. Principales alteraciones de las vías de señalización en GB.....	48
<b>I.3. Subtipos transcriptómicos y epigenómicos de GB</b> .....	<b>50</b>
I.3.1. Perfiles de expresión génica en GB .....	50
I.3.2. Perfiles de metilación en GB .....	54
I.3.3. Estudios inmunohistoquímicos de PEG en GB.....	56
<b>I.4. GB en la población pediátrica</b> .....	<b>60</b>
<b>II. Hipótesis y objetivos</b> .....	<b>61</b>
<b>II.1. Hipótesis del trabajo</b> .....	<b>63</b>

<b>II.2. Objetivos del trabajo .....</b>	<b>63</b>
II.2.1. Objetivo principal .....	63
II.2.2. Objetivos secundarios .....	63
<b>III. Materiales y métodos.....</b>	<b>65</b>
<b>III.1. Selección de los casos del estudio .....</b>	<b>67</b>
<b>III.2. Características histopatológicas de los tumores .....</b>	<b>67</b>
<b>III.3. Estudio IHQ y de FISH sobre matrices de tejido .....</b>	<b>69</b>
III.3.1. Preparación de las matrices de tejido .....	69
III.3.2. Estudio inmunohistoquímico.....	70
III.3.3. Estudio mediante FISH .....	74
<b>III.4. Detección de la variante III de EGFR .....</b>	<b>75</b>
<b>III.5. Estudio del estado de metilación del promotor del gen MGMT .....</b>	<b>75</b>
<b>III.6. Estudio de secuenciación de IDH-1 y IDH-2.....</b>	<b>76</b>
<b>III.7. Análisis estadísticos .....</b>	<b>77</b>
III.7.1. Consensus clustering .....	77
III.7.2. Resto de análisis estadísticos .....	78
<b>IV. Resultados .....</b>	<b>79</b>
<b>IV.1. Características clínicas y radiológicas de los pacientes .....</b>	<b>81</b>
<b>IV.2. Características histopatológicas de los tumores .....</b>	<b>82</b>
<b>IV.3. Frecuencia de las diferentes alteraciones moleculares.....</b>	<b>82</b>
IV.3.1. Marcadores IHQ .....	83
IV.3.2. Alteraciones de EGFR, PDGFRA, MGMT e IDH .....	86
<b>IV.4. Relación entre las características histopatológicas y las variables moleculares .....</b>	<b>88</b>
IV.4.1. Relación entre las diferentes características histopatológicas .....	88
IV.4.2. Relación entre las características histopatológicas y las variables moleculares .....	89
IV.4.3. Relación entre las diferentes variables moleculares.....	92
<b>IV.5. Variables y modelos de supervivencia .....</b>	<b>93</b>
IV.5.1. Modelo univariante.....	94
IV.5.2. Modelo multivariante .....	96
<b>IV.6. Subgrupos moleculares de GB.....</b>	<b>96</b>
IV.6.1. Distribución de los casos en subgrupos de GB según un modelo de consensus clustering.....	96
IV.6.1.1. Características moleculares de los tres subgrupos de GB según el modelo de consensus clustering.....	98

IV.6.1.2. Relación entre los subgrupos de GB según el modelo de consensus clustering y supervivencia .....	100
IV.6.2. Distribución de los casos en subgrupos de GB según un modelo tipo “árbol de decisión” .....	100
IV.6.2.1. Características moleculares de los tres subgrupos de GB según el modelo tipo “árbol de decisión” .....	101
IV.6.2.2. Características clínicas y morfológicas de los tres subgrupos de GB según el modelo tipo “árbol de decisión” .....	103
IV.6.2.2.1. “GB tipo proneural” .....	103
IV.6.2.2.2. “GB tipo clásico” .....	103
IV.6.2.2.3. “GB tipo mesenquimal” .....	104
IV.6.2.2.4. “GB tipo no clasificable” .....	104
IV.6.2.3. Relación entre los subgrupos de GB según el modelo tipo “árbol de decisión” y supervivencia .....	105
IV.6.3. Relación entre los subgrupos de GB según el modelo de consensus clustering y según el modelo tipo “árbol de decisión” .....	106
<b>V. Discusión</b> .....	<b>109</b>
<b>V.1. Subgrupos moleculares de GB</b> .....	<b>111</b>
<b>V.2. Características histopatológicas y moleculares</b> .....	<b>132</b>
V.2.1. Patrones histológicos y su relación con los subgrupos moleculares .....	132
V.2.2. Características moleculares y su relación ente sí y con las características histopatológicas .....	133
<b>V.3. Modelos de supervivencia más allá de los subgrupos moleculares de GB</b> .....	<b>137</b>
<b>V.4. Otras consideraciones</b> .....	<b>139</b>
<b>V.5. Limitaciones del estudio</b> .....	<b>139</b>
<b>VI. Conclusiones</b> .....	<b>141</b>
<b>VII. Bibliografía</b> .....	<b>145</b>
<b>VIII. Agradecimientos</b> .....	<b>175</b>



**Lista de abreviaturas:**

- All: Astrocitoma difuso grado II de malignidad de la OMS
- All-IDHm: Astrocitoma difuso grado II de malignidad de la OMS con mutación de *IDH*
- All-IDHwt: Astrocitoma difuso grado II de malignidad de la OMS sin mutación de *IDH* (del inglés *wild type*)
- AllI: Astrocitoma anaplásico (grado III de malignidad de la OMS)
- AllI-IDHm: Astrocitoma anaplásico (grado III de malignidad de la OMS) con mutación de *IDH*
- AllI-IDHwt: Astrocitoma anaplásico (grado III de malignidad de la OMS) sin mutación de *IDH* (del inglés *wild type*)
- AD: Astrocitoma difuso o infiltrante
- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- ALT: Alargamiento alternativo de los telómeros (del inglés *Alternative Lengthening of Telomeres*)
- ARN: Ácido ribonucleico
- ARNm: ARN mensajero
- AsMes: Glioblastoma tipo astrocítico mesenquimal de Motomura
- ATRX: Del inglés *α-Thalassemia/mental Retardation-syndrome-X-linked* (gen)
- ATRX: Proteína codificada por el gen *ATRX*
- ATRXm: Mutación de *ATRX*, *ATRX* mutado
- BCNU: Carmustina
- CGM: Células gigantes multinucleadas
- CISH: Hibridación *in situ* cromogénica (del inglés *Chromogenic In Situ Hybridisation*)
- CLS: Glioblastoma subtipo clásico
- CLS-Vk: Glioblastoma subtipo clásico de Verhaak
- DD: Diagnóstico diferencial
- DOC: Glioblastoma tipo oligodendrocito diferenciado de Motomura (del inglés *Differentiated Oligodendrocyte*)
- EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico (del inglés *Epidermal Growth Factor Receptor*) (gen)
- EGFR: Proteína codificada por el gen *EGFR*
- EGFRa: Amplificación de *EGFR*, *EGFR* amplificado
- EGFRvIII: Mutación o forma delecionada variante III de *EGFR* (gen)
- EGFRvIII: Variante III de *EGFR* (proteína)
- FISH: Hibridación *in situ* fluorescente (del inglés *Fluorescence In Situ Hybridization*)
- G-CIMP: Perfil hipermetilador de GB (del inglés *Glioma-CpG Island Methylator Phenotype*)

## Abreviaturas

GB: Glioblastoma

GB-C: Glioblastoma tipo clásico de nuestra clasificación

GB-IDHm: Glioblastoma con mutación de *IDH*

GB-IDHwt: Glioblastoma sin mutación de *IDH* (del inglés *wild type*)

GB-M: Glioblastoma tipo mesenquimal de nuestra clasificación

GB-NC: Glioblastoma no clasificable de nuestra clasificación

GB-P: Glioblastoma tipo proneural de nuestra clasificación

GBCG: Glioblastoma de células gigantes

GBCO: Glioblastoma con componente oligodendrogial

GBCP: Glioblastoma de células pequeñas

GBE: Glioblastoma epitelioides

GBME: Glioblastoma con metaplasia epitelial

GGLM: Glioma difuso de la línea media con mutación H3 K27M

GI: Gliomas infiltrantes

GS: Gliosarcoma

HUGTIP: Hospital Universitario Germans Trias i Pujol

*IDH*: Isocitrato deshidrogenasa (*IDH1* y *IDH2*) (gen)

*IDHm*: Mutación de *IDH1* o *IDH2*, *IDH1* o *IDH2* mutado

*IDHwt*: Ausencia de mutación de *IDH1* o *IDH2* (del inglés *wild type*)

*IDH1*: Isocitrato deshidrogenasa 1 (gen)

*IDH1-R132H*: Forma mutada de la proteína *IDH1* pR132H

*IDH1m*: Mutación de *IDH1*, *IDH1* mutado

*IDH2*: Isocitrato deshidrogenasa 2 (gen)

*IDH2m*: Mutación de *IDH2*, *IDH2* mutado

IHQ: Inmunohistoquímica

KPS: Índice de Karnofsky (del inglés *Karnofsky Performance Status*)

MES: Glioblastoma subtipo mesenquimal

MES-Ph: Glioblastoma subtipo mesenquimal de Phillips

MES-Vk: Glioblastoma subtipo mesenquimal de Verhaak

*MGMT*: O6-Metilguanina-DNA-metiltransferasa (gen)

*MGMT*: Proteína codificada por el gen *MGMT*

*Mixed*: Glioblastoma tipo mixto de Motomura

MSP: PCR específica de metilación (del inglés *Methylation-Specific PCR*)

NEU: Glioblastoma subtipo neural

NEU-Vk: Glioblastoma subtipo neural de Verhaak

OII: Oligodendroglioma grado II de malignidad de la OMS

OIII: Oligodendroglioma anaplásico (grado III de malignidad de la OMS)

- OA: Oligoastrocitoma
- OAI: Oligoastrocitoma grado II de malignidad de la OMS
- OAI: Oligoastrocitoma anaplásico (grado III de malignidad de la OMS)
- OD: Oligodendroglioma
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- OPC: Glioblastoma tipo precursor del oligodendrocito de Motomura (del inglés *Oligodendrocyte Precursor*)
- p53: Proteína codificada por el gen *TP53*
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés *Polymerase Chain Reaction*)
- PDGFRA: Receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas A (del inglés *Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha*) (gen)
- PDGFRA: Proteína codificada por el gen *PDGFRA*
- PDGFRAa: Amplificación de *PDGFRA*, *PDGFRA* amplificado
- PEG: Perfiles de expresión génica
- pGB: Glioblastoma primario
- PGFA: Proteína glial fibrilar ácida
- PH: Patrón histológico
- PH-A: Patrón histológico tipo A
- PH-B: Patrón histológico tipo B
- PH-C: Patrón histológico tipo C
- PH-D: Patrón histológico tipo D
- pMGMT: Promotor de *MGMT*
- pMGMTmet: Metilación del promotor de *MGMT*, promotor de *MGMT* metilado
- pMGMTnomet: Ausencia de metilación del promotor *MGMT*, promotor de *MGMT* no metilado
- PMV: Proliferación microvascular
- PRL-Ph: Glioblastoma subtipo proliferativo de Phillips
- PRN: Glioblastoma subtipo proneural
- PRN-Ph: Glioblastoma subtipo proneural de Phillips
- PRN-Vk: Glioblastoma subtipo proneural de Verhaak
- PsP: Pseudoprogresión
- PTEN: Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (del inglés *Phosphatase and Tensin homolog*) (gen)
- PTEN: Proteína codificada por el gen *PTEN*
- PTENm: Mutación de *PTEN*
- pTERT: Promotor de *TERT*
- pTERTm: Mutación del promotor de *TERT*, promotor de *TERT* mutado

## Abreviaturas

qPCR: PCR cuantitativa

QT: Quimioterapia

RB: Retinoblastoma

RMN: Resonancia magnética nuclear

RPA: Análisis de particiones recursivas (del inglés *Recursive Partitioning Analysis*)

RT: Radioterapia

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (del inglés *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*)

RTK: Receptores de las tirosín-cinasas

SG: Supervivencia global

sGB: Glioblastoma secundario

SINA: Sinaptofisina

SLP: Supervivencia libre de progresión

SNC: Sistema nervioso central

TCGA: Del inglés *The Cancer Genome Atlas*

*TERT*: Telomerasa transcriptasa reversa (del inglés *Telomerase Reverse Transcriptase*)  
(gen)

TERT: Proteína codificada por el gen *TERT*

TMA: Micromatriz de tejido, matriz de tejido

TMZ: Temozolomida

*TP53m*: Mutación de *TP53*, *TP53* mutado

VIM: Vimentina

XAP: Xantoastrocitoma pleomorfo

## ***I. Introducción***



## **I.1. Glioblastoma: características morfológicas y clínicas**

### ***I.1.1. Definición y frecuencia del GB***

Los gliomas son tumores primarios del sistema nervioso central (SNC) que remedan a la glía. Según el grado de infiltración del parénquima cerebral circundante se distinguen dos grandes grupos de gliomas: los gliomas infiltrantes o difusos (GI), que infiltran el tejido cerebral vecino sano de manera difusa, y los gliomas bien delimitados o circunscritos, que lo hacen de una manera más limitada. Los GI son, en la gran mayoría de los casos, irresecables y su historia natural viene marcada por la recidiva tumoral. Además, los gliomas de menor grado de malignidad tienden a progresar a un grado mayor de malignidad (Burger 2007, Sahm 2012, Wesseling 2011).

Los GI constituyen, en la población adulta y como conjunto, la segunda neoplasia primaria del SNC en frecuencia (siendo la primera el meningioma). En el SNC representan el 28% de todos los tumores primarios y el 80% de los tumores primarios malignos (Ostrom 2014).

Los GI se han clasificado tradicionalmente en tres tipos histológicos (astrocitomas, oligodendrogliomas y oligoastrocitomas) teniendo en cuenta la célula glial normal a la que remeda la célula neoplásica (astrocitos, oligodendrocitos, o ambos, respectivamente). Para cada tipo histológico, la Organización Mundial de la Salud (OMS), organismo que lidera la clasificación histológica de todas las neoplasias humanas, asigna un grado de malignidad que va del II (no existen GI de grado I) al IV, de menor a mayor agresividad. Así, y durante décadas, entre los GI se han distinguido el astrocitoma difuso (grado II de malignidad) (AII), el astrocitoma anaplásico (grado III de malignidad) (AIII), el oligodendroglioma (grado II de malignidad) (OII), el oligodendroglioma anaplásico (grado III de malignidad) (OIII), el oligoastrocitoma (grado II de malignidad) (OAII) y el oligoastrocitoma anaplásico (grado III de malignidad) (OAIII). El glioblastoma (GB) corresponde al astrocitoma infiltrante grado IV de malignidad. También se ha aplicado el término GB (concretamente como GB con componente oligodendroglial) al oligoastrocitoma grado IV de malignidad. No existen tumores oligodendrogliales puros con un grado IV de malignidad (Louis 2007).

La nueva clasificación de los tumores del SNC de la OMS, aparecida en 2016 (Louis 2016), ha supuesto un cambio importante en el abordaje del diagnóstico de los tumores del SNC. Bajo el concepto de un diagnóstico integrado, y en un intento de alcanzar una mayor objetividad, algunos tumores del SNC se definen ya no sólo por su fenotipo (su aspecto al

microscopio) sino también por su genotipo (sus alteraciones moleculares). Si nos referimos concretamente a los GI, las principales aportaciones de esta nueva clasificación han sido: 1) la práctica desaparición del grupo de los oligoastrocitomas (OA) como entidad; 2) la incorporación de un grupo nuevo de GI denominado “glioma difuso de la línea media con mutación H3 K27M”; y 3) el estudio de las mutaciones de los genes *IDH* (*IDH1* y *IDH2*), de las mutaciones de *ATRX* y de la codeleción de 1p/19q para la catalogación diagnóstica definitiva de la lesión tumoral (ver más adelante). De este modo, la actual clasificación de la OMS 2016 distingue, dentro de los astrocitomas infiltrantes, el AII y el AIII con mutación de *IDH* (AII-IDHm y AIII-IDHm) y el AII y el AIII sin mutación de *IDH* (AII-IDHwt y AIII-IDHwt, del inglés *wild type*). Las mutaciones de *ATRX* (*ATRXm*) y de *TP53* (*TP53m*) son características propias, aunque no necesarias para el diagnóstico de estirpe astrocitaria en un GI. Para el diagnóstico de OII y OIII se requiere la presencia de mutación en *IDH* (*IDHm*) y la codeleción de 1p/19q. El grupo de los OA, como se ha mencionado anteriormente, desaparecería en su práctica totalidad y los tumores antes englobados bajo este concepto se reclasifican como astrocitomas difusos (AD) u oligodendrogliomas (OD), en función de las alteraciones moleculares detalladas arriba. La OMS contempla la posibilidad de casos donde el estudio molecular no pueda llevarse a cabo (por no disponer, por ejemplo, de suficiente material tisular) y propone realizar el diagnóstico morfológico clásico en esas situaciones, mencionando esta eventualidad como NOS (del inglés *Not Otherwise Specified*) (ej. AII, NOS). En los casos donde el aspecto morfológico y el perfil molecular no concuerden, el diagnóstico se realizará en base a los datos moleculares, aunque no todos los componentes del grupo de expertos de la OMS secundarían esta decisión (comunicación personal del Dr Wesseling). En el caso concreto del GB (que sigue correspondiendo a un AD grado IV de malignidad), la nueva clasificación de la OMS 2016 establece dos grupos claramente diferentes que, al igual que el resto de los AD, se denominan GB con mutación de *IDH* (GB-IDHm) y GB sin mutación de *IDH* (GB-IDHwt) (Figura 1) (Louis 2016).

En el SNC el GB, en su conjunto, representa el 15% de todos los tumores primarios y el 45% de los tumores primarios malignos en la población adulta (Ostrom 2014).

<b>Diffuse astrocytic and oligodendroglial tumours</b>	
Diffuse astrocytoma, IDH-mutant	9400/3
Gemistocytic astrocytoma, IDH-mutant	9411/3
<i>Diffuse astrocytoma, IDH-wildtype</i>	9400/3
Diffuse astrocytoma, NOS	9400/3
Anaplastic astrocytoma, IDH-mutant	9401/3
<i>Anaplastic astrocytoma, IDH-wildtype</i>	9401/3
Anaplastic astrocytoma, NOS	9401/3
Glioblastoma, IDH-wildtype	9440/3
Giant cell glioblastoma	9441/3
Gliosarcoma	9442/3
<i>Epithelioid glioblastoma</i>	9440/3
Glioblastoma, IDH-mutant	9445/3*
Glioblastoma, NOS	9440/3
Diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant	9385/3*
Oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	9450/3
Oligodendroglioma, NOS	9450/3
Anaplastic oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	9451/3
<i>Anaplastic oligodendroglioma, NOS</i>	9451/3
<i>Oligoastrocytoma, NOS</i>	9382/3
<i>Anaplastic oligoastrocytoma, NOS</i>	9382/3

**Figura 1:** Clasificación actual de los gliomas infiltrantes en gliomas IDHm y IDHwt. En la nueva clasificación de la OMS, los astrocitomas difusos y los oligodendrogliomas se agrupan en una misma categoría diagnóstica, a diferencia de lo que ocurría en las clasificaciones anteriores, donde los tumores se agrupaban por tipo histológico (Louis 2016)

### 1.1.2. Características histopatológicas del GB

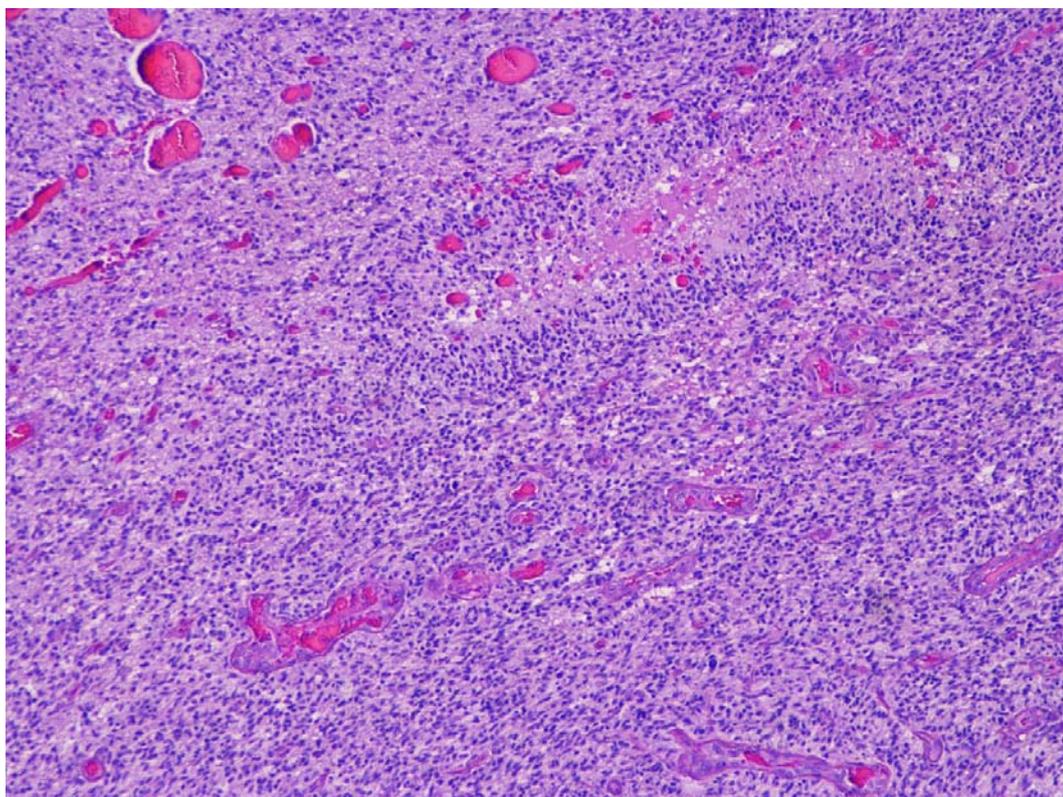
El ahora denominado GB ha sido conocido durante muchos años como GB multiforme y, de hecho, muchos autores todavía lo denominan así. El término de GB multiforme fue acuñado por Mallory en 1914 (Mallory 1914) y adaptado como parte del léxico neuropatológico por Bailey y Cushing en 1926 (Bailey 1926). Su nombre hace referencia al aspecto macroscópico e histológico heterogéneo de la lesión, que, incluso en un mismo caso, puede mostrar varios patrones morfológicos.

En su forma más clásica, el GB se encuentra constituido por una población heterogénea de astrocitos neoplásicos de aspecto fibrilar y gemistocítico, con atipia nuclear, pleomorfismo y actividad mitótica. El componente fibrilar muestra núcleos alargados, irregulares e hipercromáticos, escaso citoplasma y procesos que forman una matriz laxa. Las células gemistocíticas presentan, típicamente, un citoplasma amplio y eosinófilo, procesos escasos y cortos y un núcleo excéntrico. En muchas ocasiones se observan células gigantes multinucleadas (CGM) que, a pesar de su apariencia maligna, probablemente corresponden a cambios celulares regresivos (Miller 2007).

Independientemente del componente neoplásico más o menos heterogéneo, lo que define histológicamente al GB es o bien la presencia de proliferación microvascular (PMV)

acompañante, o bien la presencia de necrosis, o ambas a la vez, siempre en el contexto de una neoplasia astrocitaria infiltrante. La PMV se define como la proliferación de células endoteliales y perivasculares formando agregados que simulan un glomérulo renal (de ahí el nombre a veces empleado de proliferación vascular glomeruloide). Otra forma menos común de PMV es la proliferación en forma de células endoteliales hipertróficas en vasos de mediano calibre (Louis 2016). La necrosis se ha diferenciado históricamente en necrosis de tipo infarto y necrosis con empalizada nuclear (denominada anteriormente necrosis con pseudoempalizada), donde las células neoplásicas se disponen agrupadas en torno a un centro necrótico, con el núcleo orientado en sentido perpendicular al mismo. En el GB con necrosis se puede observar uno o los dos patrones descritos a la vez (Figura 2) (Perry 2010).

Al igual que el resto de astrocitomas, el GB muestra, a nivel inmunohistoquímico (IHQ), positividad variable para marcadores tales como proteína glial fibrilar ácida (PGFA), Olig2 y proteína S100. El índice de proliferación celular (o índice de Ki67) es muy variable y se encuentra en torno al 15-20%. Muchos de los GB-IDHm son inmunopositivos con el anticuerpo anti-IDH1-R132H, que reconoce la forma mutada p.R132H de la proteína IDH1, la forma más frecuente de *IDHm* (ver más adelante).



**Figura 2:** Imagen histológica característica de un glioblastoma. Se observa una proliferación astrocitaria de características neoplásicas con proliferación microvascular (flecha fina) y necrosis con empalizada nuclear (flecha gruesa)

### **I.1.3. Tipos de GB**

Los GB se han clasificado clásicamente en GB secundarios y GB primarios, según deriven de la progresión o no de un glioma previo de menor grado. Además, existen diferentes variantes morfológicas y patrones histológicos de GB que conviene conocer (Louis 2007 y Louis 2016).

#### **I.1.3.1. GB primarios y secundarios: GB-IDHwt y GB-IDHm**

La mayoría de los GB se originan de *novo*, es decir, debutan clínica y radiológicamente con un grado IV de malignidad. Son los conocidos como GB primarios (pGB, o GB tipo 2). No obstante, existe un pequeño grupo de GB, que representaría según las diferentes series alrededor del 5% del total de los casos, en el que el GB se desarrolla como progresión de un AD previo de menor grado (II o III). A estos GB se los denomina GB secundarios, GB progresivos o GB tipo 1 (sGB). La definición de sGB es, pues, un GB que se ha desarrollado en un paciente donde existe evidencia anatomopatológica o radiológica de una lesión previa de menor grado. Los sGB aparecen en edades más tempranas (mediana de edad de 45 años frente a 62 años para los pGB) y muestran una supervivencia superior (7,8 meses frente 4,7 meses, en las series más antiguas) (Ohgaki 2004).

Muchos son los estudios que han descrito la existencia de diferencias a nivel molecular entre estos dos grupos de GB. Tradicionalmente, se han descrito como características propias de los pGB la amplificación de *EGFR* (*EGFRa*) y las mutaciones de *PTEN* (*PTENm*), mientras que los sGB se caracterizan por *TP53m* (ver más adelante) (Ohgaki 2007). De todos modos, estos patrones moleculares no permiten separar claramente los dos tipos de GB. Tampoco existen diferencias a nivel histológico entre los pGB y los sGB y, por tanto, hasta hace relativamente poco el único criterio diferencial ha sido la evidencia o no de una lesión previa de menor grado.

En la actualidad, con la segregación del GB en GB-IDHm y GB-IDHwt, la clasificación de los GB en pGB y sGB ha quedado desplazada, pues los sGB se corresponderían, en su mayoría, con los GB-IDHm y los pGB con los GB-IDHwt. De esta forma, las características clínicas y moleculares que antes mencionábamos para los sGB y los pGB son, en rasgos generales, aplicables a los GB-IDHm y los GB-IDHwt, respectivamente (Tabla 1). Con esta nueva definición de sGB (como GB-IDHm) su frecuencia ascendería al 10% del total de los casos de GB (frente al 5% descrito con anterioridad) (Ohgaki 2013).

	<b>GB-IDHwt</b>	<b>GB-IDHm</b>
<b>Sinónimo</b>	GB primario	GB secundario
<b>Lesión precursora</b>	No identificable	All, AIII
<b>Proporción de GB</b>	90%	10%
<b>Edad mediana al diagnóstico</b>	62 años	44 años
<b>Relación hombre/mujer</b>	1,42/1	1,05/1
<b>Tiempo de historia clínica</b>	4 meses	15 meses
<b>Supervivencia (mediana)</b>	15 meses	31 meses
<b>Localización</b>	Supratentorial	Preferentemente frontal
<b>Necrosis</b>	Extensa	Limitada
<b>pTERTm</b>	72%	26%
<b>TP53m</b>	27%	81%
<b>ATRXm</b>	Excepcional	71%
<b>EGFRa</b>	35%	Excepcional
<b>PTENm</b>	24%	Excepcional

**Tabla 1:** Principales características de los GB-IDHwt y los GB-IDHm. (pTERTm: mutación del promotor de TERT; TP53m: mutación de TP53; ATRXm: mutación de ATRX; EGFRa: amplificación de EGFR; PTENm: mutación de PTEN) (adaptado de Louis 2016)

Los GB-IDHm son GB que acontecen en pacientes más jóvenes, que afectan preferentemente lóbulos frontales y que muestran un pronóstico significativamente mejor al resto de GB (Louis 2016). Morfológicamente son indistinguibles de los GB-IDHwt, aunque los GB-IDHm suelen tener menos necrosis y presentan, con mayor frecuencia, un componente de aspecto oligodendroglial (Nobusawa 2009). Bajo el punto de vista molecular, los GB-IDHm se caracterizan por una alta frecuencia de TP53m y ATRXm, a diferencia de los GB-IDHwt, que muestran EGFRa, PTENm, mutación del promotor de TERT (pTERTm) y pérdida completa del cromosoma 10 (Louis 2016). Más del 90% de los GB-IDHm corresponden al subtipo transcriptómico proneural (Verhaak 2010). Además, los GB-IDHm muestran un fenotipo hipermetilador, común a todas las neoplasias con IDHm (Noushmehr 2010) (los aspectos moleculares de los GB se tratarán con más detalle con posterioridad).

### **I.1.3.2. Variantes y patrones histológicos de GB**

La actual clasificación de la OMS reconoce, además de las dos entidades de GB (GB-IDHm y GB-IDHwt), tres variantes morfológicas que se engloban dentro de los GB-IDHwt: el GB de células gigantes, el gliosarcoma y el GB epiteliode. Existen, además, otros muchos patrones histológicos que no se incluyen como variantes en la clasificación actual, como el GB de

células pequeñas, el GB con componente oligodendroglial, o el GB con metaplasia epitelial, entre otros.

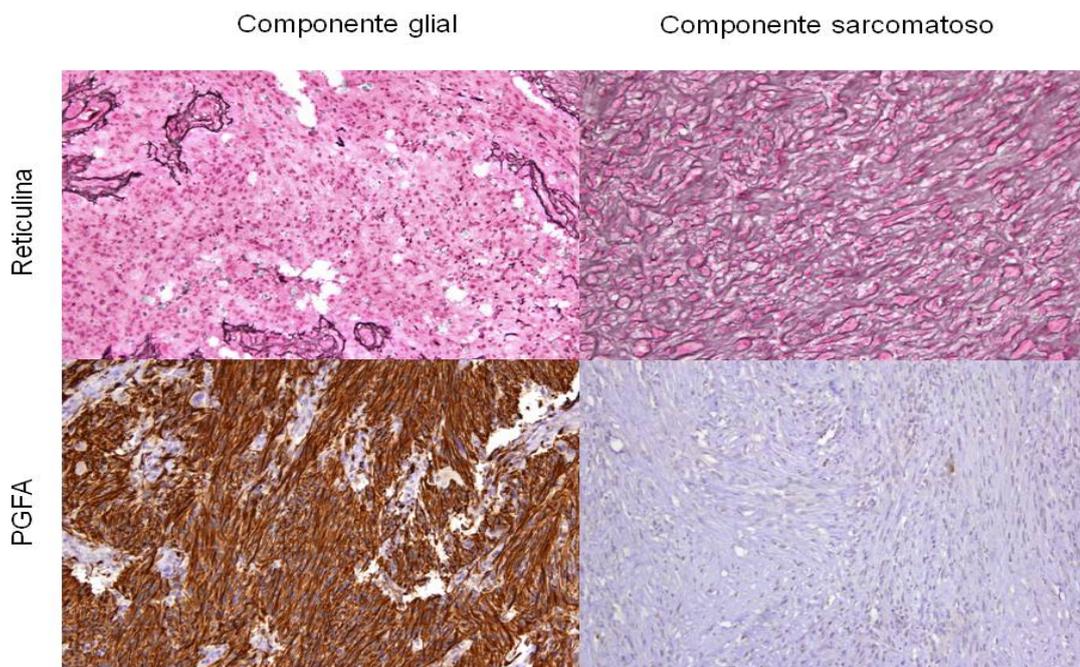
#### **I.1.3.2.1. GB de células gigantes**

El GB de células gigantes (GBCG) representa menos del 1% de los GB. Constituye una entidad clínico-patológica que se caracteriza histológicamente por un numeroso componente de CGM bizarras, un componente de células astrocitarias de menor tamaño, fusiformes y sincitiales, y una rica trama de fibras de reticulina (Figura 4a). Desde el punto de vista radiológico son tumores bien delimitados y superficiales que asientan, en la mayoría de los casos, en los lóbulos temporales o parietales, por lo que la resección quirúrgica suele ser extensa, y acontecen preferiblemente en población joven (media de edad de 51 años) (Louis 2016). Es probablemente por todo ello que en algunos estudios el GBCG parece tener un mejor pronóstico que el GB tipo convencional (Kozak 2009). Los análisis moleculares de este tipo de GB revelan, además de la ausencia de *IDHm*, una alta tasa de *TP53m* y de *PTENm* y una baja frecuencia de *EGFRa* (Louis 2016).

#### **I.1.3.2.2. Gliosarcoma**

El gliosarcoma (GS) representa un 2% de los GB y puede aparecer como una lesión de *novo* o tras la recurrencia (habitualmente después de tratamiento con radioterapia). El GS corresponde también a una entidad clínico-patológica caracterizada histológicamente por un patrón de crecimiento bifásico, con un componente glial y un componente mesenquimal de origen metaplásico, ambos de naturaleza maligna. El componente glial puede presentar cualquiera de los patrones del GB. El componente sarcomatoso presenta una morfología muy variada con diferenciación fibroblástica, cartilaginosa, ósea, muscular o adiposa (Han 2010). En todos los casos, en estas áreas mesenquimales se observa una pérdida en la expresión de PGFA y un marcado depósito de matriz extracelular evidente con la tinción de reticulina que contrasta con el patrón pobre en reticulina e inmunopositivo para PGFA del componente glial (Figura 3). Desde el punto de vista radiológico son tumores bien delimitados y superficiales que asientan, en la mayoría de los casos, en los lóbulos temporales (Louis 2016). Aunque algunas series atribuyen al GS un pronóstico más favorable (Lutterbach 2001), la gran mayoría de los estudios no encuentran diferencias en supervivencia entre éstos y el resto de GB (Louis 2016). Bajo el punto de vista molecular, son GB-IDHwt en los que se ha descrito una menor frecuencia de metilación del promotor de *MGMT* (*pMGMTmet*) y de *EGFRa* cuando se comparan con el grupo general de GB (Lee

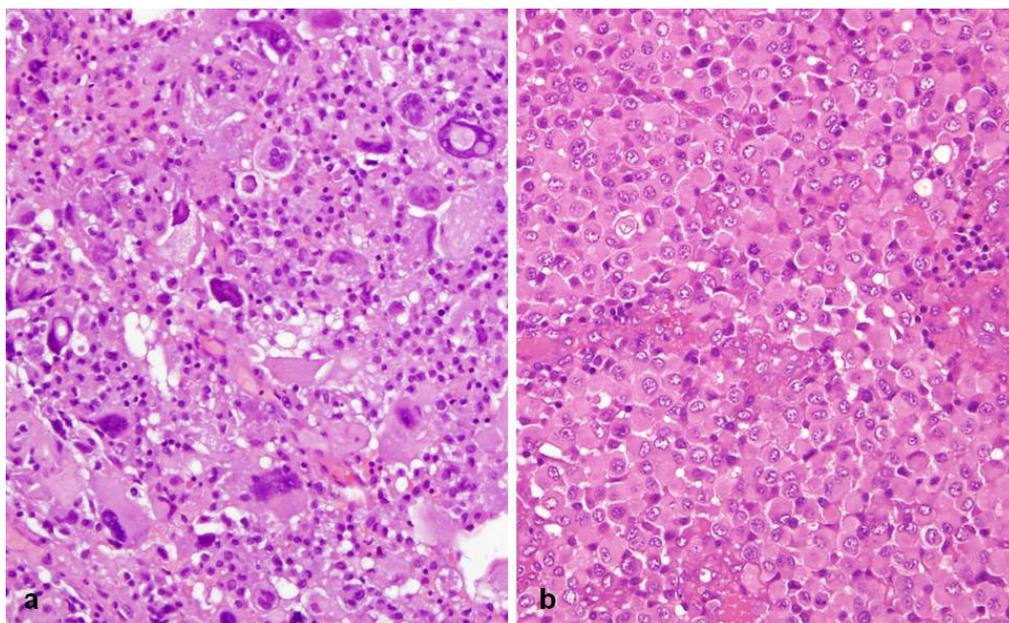
2012). Además, los GS se caracterizan por *PTENm* y *TP53m* y por deleciones en *CDKN2A* (Louis 2016).



**Figura 3:** Imagen histológica de las diferentes variantes de GB. Gliosarcoma. En la imagen se muestran las dos áreas diferenciadas del tumor: un componente glial, con negatividad para reticulina y positividad para PGFA, y un segundo componente sarcomatoso, rico en fibras de reticulina y negativo para PGFA

### 1.1.3.2.3. GB epitelioides

El GB epitelioides (GBE) es una variante de GB-IDHwt que ha sido introducida por primera vez en la reciente actualización de la clasificación de la OMS de 2016. Se define como un AD de alto grado (con actividad mitótica, necrosis y PMV) caracterizado por una población tumoral de aspecto uniforme, con células epitelioides y discohesivas, que muestran un crecimiento en sábana. Estas células tienen una membrana celular bien definida, un citoplasma eosinófilo, escasos procesos celulares y un núcleo lateralizado (Figura 4b) (Louis 2016). Este tipo de lesiones afectan con más frecuencia a adultos jóvenes y niños y muestran una elevada tendencia a la diseminación leptomenígea, presente hasta en un tercio de los casos (Momota 2011). Los pacientes con GBE presentan un peor pronóstico que los que sufren cualquier otro tipo de GB (supervivencia media de 6,3 meses) (Louis 2016). El GBE puede coexistir con un xantastrocitoma pleomorfo (XAP), que es un tumor astrocitario del grupo de los denominados gliomas bien circunscritos. Bajo el punto de vista molecular, hasta el 50% de los GBE presentan la mutación V600 de *BRAF* (Kleinschmidt-DeMasters 2013), de modo similar a lo que sucede en el XAP. Se ha descrito la presencia de *EGFRa*, deleción de *CDKN2A* y pérdida de *PTEN* en algunos casos de GBE (Broniscer 2014).



**Figura 4:** Imagen histológica de las diferentes variantes de GB. (a) GB de células gigantes (b) GB epitelioides

#### **I.1.3.2.4. Patrones de GB**

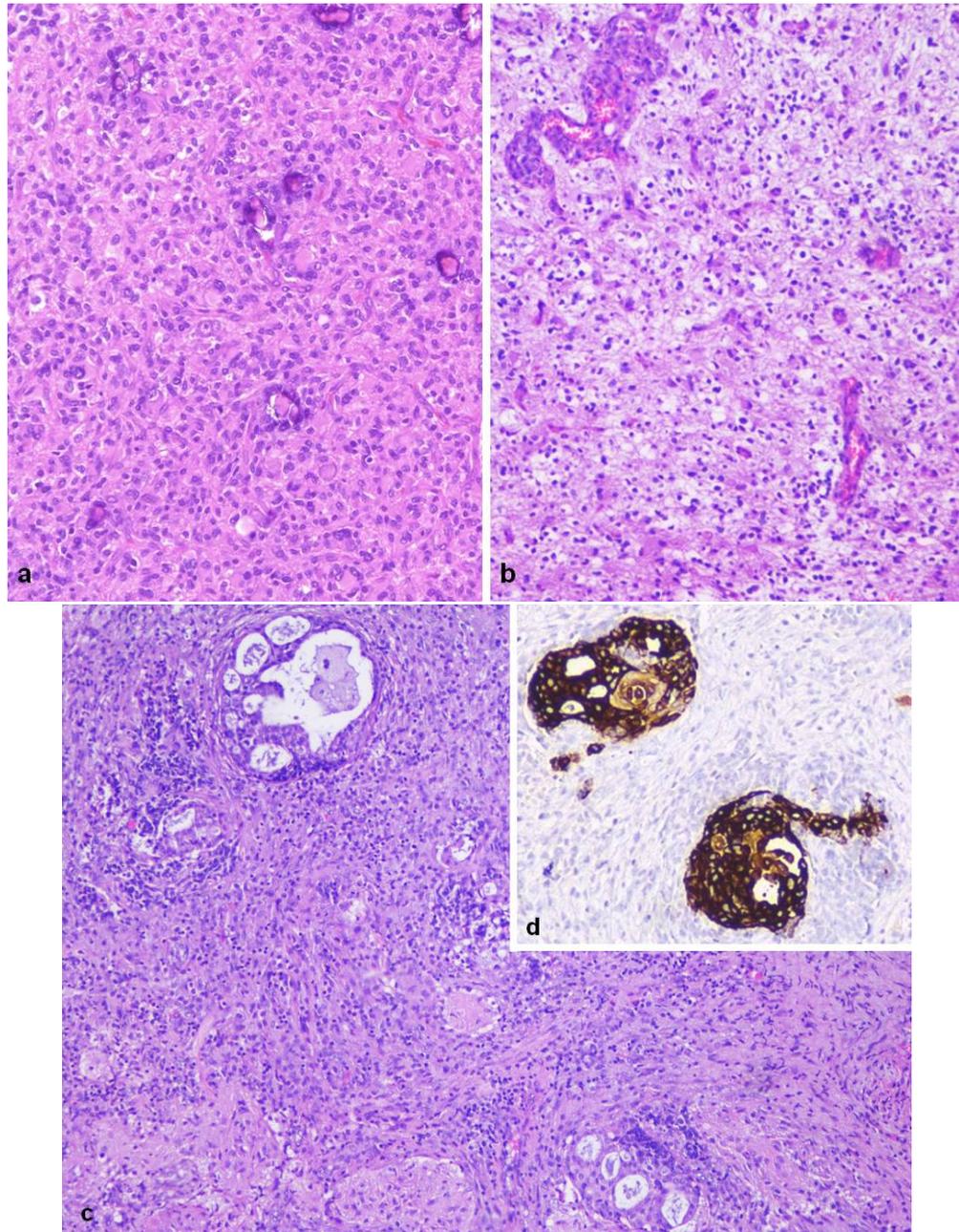
A diferencia de las variantes, los patrones de GB no son entidades clínico-patológicas definidas, con diferente pronóstico o presentación clínica, sino que constituyen meras variaciones en el aspecto histológico del tumor.

El GB de células pequeñas (GBCP) es un patrón morfológico que se observa en aproximadamente el 10% de los casos de GB. Las características histológicas propias de este tipo de GB son su citología de apariencia benigna y su marcada actividad proliferativa. Las células neoplásicas son monótonas, con un citoplasma difícilmente discernible y un núcleo oval, pequeño y con poca hiperchromasia. Son frecuentes la presencia de halos claros perinucleares y una vasculatura delicada, en “red de gallinero”, características histológicas que se observan también en los tumores oligodendrogiales. Además, pueden presentar microcalcificaciones, de igual modo que los OD (Figura 5a). La designación de GBCP se aplica a aquellos tumores donde este patrón se observa de manera predominante según la OMS (Louis 2016), o en más del 80% del tumor o de forma pura según algunos autores. No obstante, hasta el 11%-36% de los GB muestran focos de células pequeñas que no alcanzarían esta proporción (Burger 2001, Perry 2004). La importancia principal de este patrón estriba en su similitud con el OIII. El estudio de la codeleción de 1p/19q, presente hasta en el 80% de los OIII y ausente, por definición, en el GB, así como la determinación de *EGFRa*, descrita hasta en el 83% de los casos de GBCP y ausente en los OIII, constituyen herramientas diagnósticas de gran utilidad en este contexto (Perry 2004).

El GB con componente oligodendroglial (GBCO) constituyó un nuevo patrón de GB introducido por primera vez en la clasificación de la OMS del año 2007. Correspondía a dos situaciones diferentes: a un OAIII con necrosis y a un GB con ocasionales focos de aspecto oligodendroglial (Louis 2007) (Figura 5b). La inclusión de esta entidad en la clasificación de la OMS se basó en los resultados de dos estudios diferentes en los que se mostraba que estos casos presentan un pronóstico a medio camino entre el OAIII y el GB (Miller 2006, van den Bent 2006). Algunos trabajos aparecidos recientemente demuestran que, desde el punto de vista molecular, los GBCO corresponden a un grupo heterogéneo de lesiones en el que se habrían incluido casos de OIII y de GB. Estos trabajos proponen una clasificación de los GBCO (y de todos los gliomas de alto grado en general) basada en la determinación de la *IDHm* y la codeleción de 1p/19q, distinguiendo tres grupos moleculares con diferente pronóstico: los casos con codeleción de 1p/19q (los de mejor pronóstico, que según la nueva clasificación de 2016 corresponderían a OIII), los casos con *IDHm* sin codeleción (los ahora denominados GB-IDHm) y los casos no mutados (los de peor pronóstico, o GB-IDHwt) (Figarella-Branger 2015, Sahm 2014). De este modo, el GBCO ha desaparecido de la terminología actual junto con el grupo de los OA, y así se refleja en la nueva clasificación de la OMS.

Algunos GB pueden mostrar focos de metaplasia epitelial (GBME), en forma de diferenciación escamosa o glandular, con disminución de la expresión de PGFA en este componente y adquisición de la expresión de marcadores epiteliales (citoqueratinas) (Figura 5c). Este hecho es más frecuente entre los GS. A nivel molecular, los GBME muestran una elevada frecuencia de deleciones de *CDKN2A* (Rodriguez 2008).

Por último, la nueva clasificación de la OMS reconoce la denominada gliomatosis cerebri (incluida en la clasificación de 2007 como una entidad diagnóstica) como un simple patrón de crecimiento del GB o, incluso, de GI de menor grado (Louis 2016).



**Figura 5:** Imagen histológica de los diferentes patrones de GB. **(a)** GB de células pequeñas. **(b)** GB con componente oligodendroglial. **(c)** GB con metaplasia epitelial e inmunopositividad para citoqueratinas **(d)**

#### ***1.1.3.2.5. Glioma difuso de la línea media con mutación H3 K27M***

El glioma difuso de la línea media con mutación H3 K27M (GDLM) es una nueva entidad dentro de los GI, introducida por primera vez en la clasificación de la OMS en el año 2016.

La OMS la define como un GI de alto grado (por definición corresponde a un grado IV de malignidad), que ocupa la línea media (el tronco del encéfalo, tálamo o médula espinal), de

diferenciación predominantemente astrocitaria y con mutación K27M en los genes *H3F3A* o *HIST1H3B/C* (Louis 2016).

El GDLM es más frecuente entre la población pediátrica, aunque también puede observarse en adultos y, en algunos casos, en otras localizaciones, tales como la región pineal o el hipotálamo (Solomon 2016). La entidad anteriormente conocida como glioma pontino intrínseco difuso se englobaría ahora en este grupo de lesiones (Buczkwicz 2015).

El aspecto histológico del GDLM es muy variable e incluye lesiones con poca celularidad y ausencia de mitosis, PMV o necrosis y lesiones con la morfología típica de un GB (Louis 2016). En todos los casos se observa una mutación K27M afectando a H3.3 (codificada por *H3F3A*) o a H3.1 (codificada por *HIST1H3B* o *HIST1H3C*) como rasgo que define la entidad. Esta mutación puede detectarse mediante estudio IHQ con un anticuerpo específico para la proteína mutada. La mayor parte de los casos de GDLM son inmunopositivos para p53 y muestran pérdida de la expresión proteica de ATRX (Solomon 2016).

### ***1.1.4. Características clínicas y radiológicas del GB***

Como en muchas otras lesiones que afectan al SNC, la presentación clínica de los GB varía según la localización de la lesión. Los AD, como grupo, asientan frecuentemente en los hemisferios cerebrales. En el caso de los GB éstos muestran una especial predilección por los lóbulos temporales, frontales y parietales y es muy característica la afectación frontotemporal. Los GB-IDHwt muestran una distribución anatómica muy variada, mientras que los GB-IDHm asientan con mayor frecuencia en los lóbulos frontales (Lai 2011). En conjunto, los GB suelen estar centrados en la sustancia blanca subcortical y tienen una gran tendencia a infiltrar el córtex cerebral suprayacente, estructuras profundas y, en ocasiones, el hemisferio contralateral. Hasta el 2,4% de GB son multifocales desde el punto de vista histológico (Batzdorf 1963).

Los GB pueden afectar a pacientes de todas las edades, aunque son más frecuentes en la población adulta, con un pico de incidencia entre los 75 y los 84 años y una mediana de edad de 64 años. La relación hombre/mujer se sitúa en torno a 1,6 (Ostrom 2014). En los casos de GB-IDHm, la edad mediana de presentación se sitúa en torno a los 44 años y la relación hombre/mujer es de 1,05 (Nobusawa 2009).

Los síntomas más frecuentes son la aparición de crisis comiciales, alteraciones en el comportamiento, déficits motores y síntomas secundarios al aumento de la presión intracraneal. En el caso del GB, como constituye un tumor de alto grado con una alta tasa de crecimiento, la historia clínica suele ser de corto tiempo de evolución (aproximadamente 4 meses) y rápidamente progresiva, particularmente en los GB-IDHwt (Ohgaki 2007).

El aspecto en la resonancia magnética nuclear (RMN) del GB es el de una lesión infiltrante en secuencias T2-FLAIR, donde la hiperintensidad refleja la presencia de edema vasogénico generado en respuesta a la infiltración del parénquima cerebral por las células tumorales. A este componente infiltrativo se añade, en el caso de los astrocitomas de alto grado (III-IV), una captación tras la administración de contraste que en el GB puede ser en anillo, donde el centro del anillo es una porción de baja densidad que se corresponde con el centro necrótico de la lesión. La periferia del anillo, en cambio, es la parte que capta contraste y corresponde al frente tumoral viable, con marcada vascularización y disrupción de la barrera hematoencefálica. Si el GB atraviesa el cuerpo calloso, la imagen radiológica de la afectación de los centros semiovais provoca la conocida “imagen en mariposa”. Además de la lesión en sí, las pruebas de imagen suelen revelar signos secundarios al efecto masa que la tumoración provoca en el parénquima cerebral, tales como el desplazamiento de la línea media, la compresión ventricular o el borramiento de los surcos (Perry 2010). La RMN constituye también la prueba de imagen de elección para la valoración de la respuesta al tratamiento (Wen 2010). Algunas técnicas más sofisticadas, como la espectroscopia o las secuencias de difusión y perfusión, así como la tomografía por emisión de positrones (PET) con aminoácidos, pueden ayudar en el diagnóstico diferencial (DD) radiológico del GB con gliomas de bajo grado o con otro tipo de lesiones como abscesos, metástasis o linfomas (Pope 2016).

### ***1.1.5. Pronóstico y tratamiento del GB***

Por su naturaleza infiltrativa, los GI en general, y el GB en particular, son tumores irresecables, en los que la progresión a un grado mayor de malignidad (en los casos de gliomas de grado II y III) y la recidiva tumoral tras la cirugía y el tratamiento adyuvante son la regla. Así, pues, el GB se considera una neoplasia incurable, con una supervivencia mediana de 15 meses tras el tratamiento estándar (ver más adelante) (Stupp 2009). Muchos tumores responden mal al tratamiento convencional y aquellos en los que se consigue un control de la enfermedad a menudo no gozan de una respuesta duradera. No obstante, hasta el 5% de los pacientes con GB están vivos a los 5 años (Ostrom 2014).

En cuanto al pronóstico, son factores pronósticos clínicos reconocidos para los gliomas de alto grado (grados III y IV) la edad, el estado general (medido con el índice de Karnofsky o KPS, con la puntuación en la escala diseñada por el *Eastern Cooperative Oncology Group* o ECOG, o con el estado general según la escala de la OMS o WHO-PS, del inglés *World Health Organization Performance Status*), el estado cognitivo (MMSE, del inglés *Minimental Status*) y la radicalidad de la cirugía. En base a estos y otros factores (como el tiempo transcurrido entre el inicio de los síntomas y el diagnóstico, el grado de malignidad III o IV y la dosis de radioterapia recibida) se creó una clasificación pronóstica (que vendría a sustituir a los métodos de estadificación clásicos que se aplican a las neoplasias de otros órganos) denominada RPA (del inglés *Recursive Partitioning Analysis*) (Curran 1993) que permite comparar los resultados obtenidos con los diversos esquemas de tratamiento utilizados en los diferentes estudios. Esta clasificación ha sido modificada con posterioridad (RPA-EORTC) y validada para el tratamiento estándar con radioterapia y temozolomida (Mirimanoff 2006). Para los pacientes con GB se reconocen 3 clases diferentes (III, IV y V), como se indica en el esquema adjunto (Tabla 2).

Clase RPA-EORTC	Definición
III	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Edad inferior a 50a</li> <li>• WHO-PS=0</li> </ul>
IV	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Edad inferior a 50a</li> <li>• WHO-PS=1 ó 2 o bien</li> <li>• Edad igual o superior a 50a</li> <li>• Resección quirúrgica completa o parcial</li> <li>• MMSE igual o superior a 27</li> </ul>
V	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Edad igual o superior a 50a</li> <li>• MMSE inferior a 27 ó biopsia</li> </ul>

**Tabla 2:** Grupos pronósticos de GB según la escala RPA-EORTC. En la tabla se detallan los factores pronóstico incluidos en la clasificación RPA-EORTC y validados para casos de GB con tratamiento estándar. Los casos de GB pueden corresponder a una clase III, IV o V de la RPA-EORTC (según la combinación de los diferentes factores pronósticos). Las clases I y II se reservan para los gliomas de grado III (WHO-PS: estado general; MMSE: estado cognitivo)

No existen factores morfológicos establecidos que permitan predecir diferencias en el pronóstico del GB, aunque algunos autores han descrito la presencia de necrosis como un factor de mal pronóstico (Homma 2006).

En relación a los factores moleculares, y aunque existen muchos trabajos en la literatura que proponen un gran número de marcadores, los únicos factores con reconocida utilidad pronóstica en el GB son el estado de la metilación del promotor de MGMT (*pMGMTmet*) y la *IDHm* (Berghoff 2013). Algunos trabajos apuntan que el índice de proliferación celular (Ki67) y la pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 10 constituirían, también, factores pronósticos en el GB, aunque de menor peso (Thuy 2015).

El tratamiento del GB a día de hoy incluye la cirugía, con la resección tumoral máxima posible. En los casos irresecables debe obtenerse al menos una muestra del tumor para el diagnóstico histológico definitivo (Stupp 2014).

Tras la cirugía, el tratamiento estándar en pacientes de hasta 70 años de edad (y también en pacientes de más de 70 años con un buen estado general) es, desde el año 2005, radioterapia (RT) con temozolomida (TMZ) concomitante y adyuvante (Stupp 2005, Stupp 2009). La *pMGMTmet* constituye, además de un factor de buen pronóstico, un marcador predictivo de respuesta a la TMZ. Aun así, los pacientes sin metilación del promotor de MGMT (*pMGMTnomet*), ante la ausencia de una opción terapéutica mejor, son tratados con esta misma pauta (Hegi 2005). En los ancianos (considerados según diferentes grupos como aquellos pacientes mayores de 65 o 70 años), si su estado general no permite el tratamiento combinado con RT y TMZ, se recomienda tratamiento únicamente con RT en aquellos pacientes con *pMGMTnomet* y tratamiento con TMZ en los casos con *pMGMTmet* (Weller 2014).

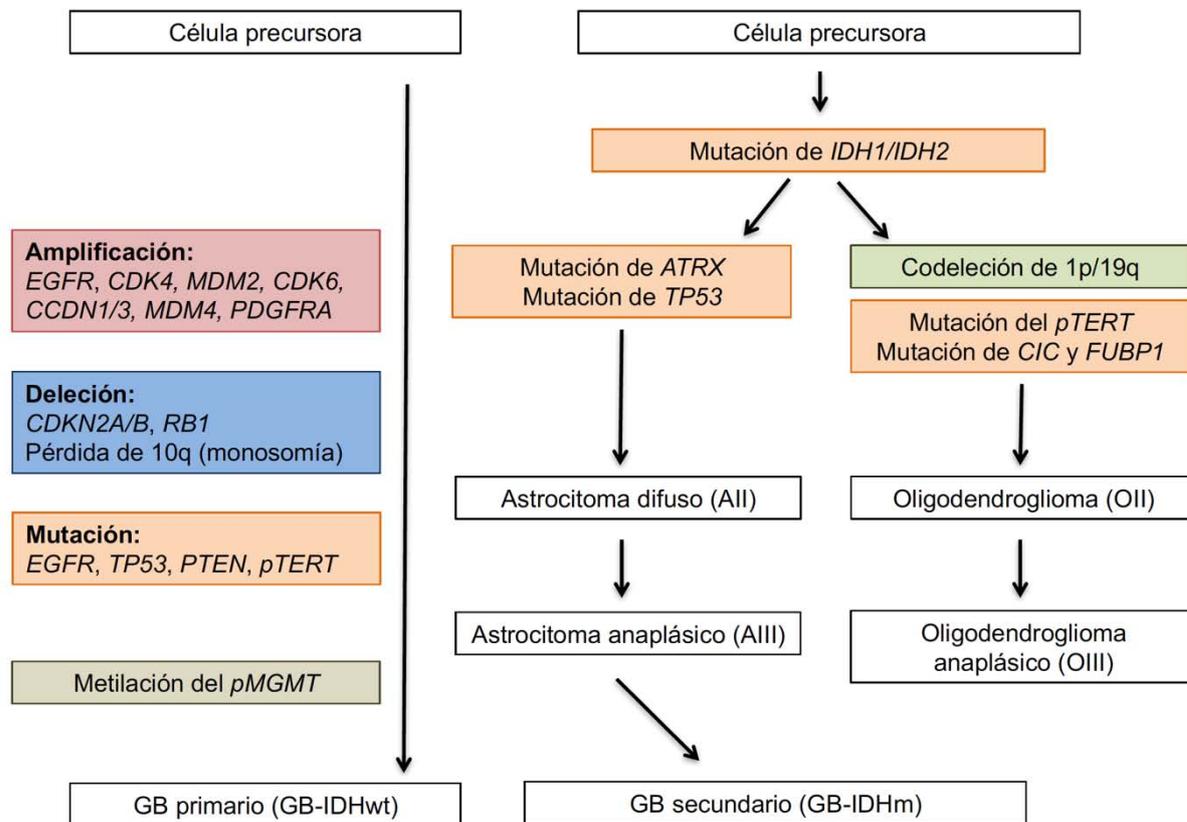
## **I.2. Principales alteraciones moleculares en GB**

En los últimos años hemos asistido a un gran progreso en el conocimiento de las alteraciones moleculares que subyacen al origen y la progresión de los gliomas. Prueba de ello es la clasificación de la OMS 2016 que, como ya se ha mencionado, integra el genotipo de los tumores en el diagnóstico de los Gl.

En este apartado se detallarán, primero, las alteraciones moleculares en el conjunto de los Gl para abordar después, y con más detenimiento, aquellas que son más frecuentes en el grupo de los GB.

### 1.2.1. Principales alteraciones moleculares en el conjunto de los gliomas infiltrantes

En la Figura 6 se muestra un esquema del estado actual de la situación que, aunque simplificado, puede servir, a modo de referencia, para lo que a partir de ahora se expondrá.



**Figura 6:** Principales alteraciones moleculares en los diferentes grupos de gliomas infiltrantes. (pTERT: promotor de TERT, pMGMT: promotor de MGMT)

En esta figura observamos claramente las dos vías de desarrollo del GB: la vía de los pGB, sin IDHm (GB-IDHwt), y la vía de los sGB, con IDHm (GB-IDHm).

En este esquema se muestra, también, que las alteraciones moleculares que presentan la mayoría de los casos de AII y AIII (en la actual clasificación de la OMS considerados como AII-IDHm y AIII-IDHm) pueden verse en casos de GB, pero únicamente en los sGB o GB-IDHm. Por tanto, aunque pueden estar presentes, estas alteraciones son muy infrecuentes en el grupo de GB en general, a diferencia de lo que pasa con las alteraciones moleculares que se observan en el grupo de los pGB o GB-IDHwt, el grupo mayoritario de GB.

Las alteraciones propias de los OD no se observan en los GB que, por definición, son tumores astrocitarios. Estas alteraciones corresponden a la codelección de 1p/19q y las mutaciones de *CIC* y *FUBP1* que, por tanto, no se comentarán más que de manera somera.

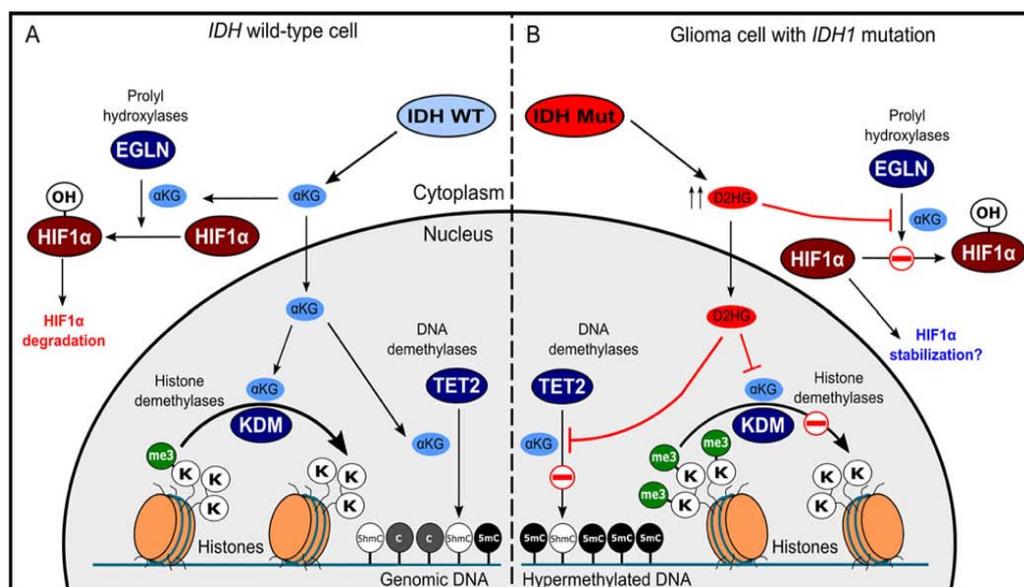
No se incluirá en el texto ninguna referencia a los gliomas no infiltrantes (también denominados circunscritos o bien delimitados) como el astrocitoma pilocítico, el astrocitoma subependimario de células gigantes o el XAP. Estos tumores presentan unas alteraciones moleculares completamente diferentes a las observadas en los GI, con afectación de las vías de señalización de MAPK y mTOR (Louis 2016).

### ***1.2.1.1. Mutación de IDH***

Como se constata en la Figura 6, las mutaciones de *IDH* (*IDHm*) se observan en los GI de todos los tipos histológicos y todos los grados de malignidad.

En el año 2008, Parsons y col describieron, por primera vez, la existencia de mutaciones en el gen *IDH1* (*isocitrato deshidrogenasa 1*) (*IDH1m*) en los GI. En un estudio de secuenciación masiva que exploraba el genoma de una serie de GB, estos autores observaron que una pequeña proporción de los mismos (18 de los 149 casos) tenían *IDH1m*, y que esta alteración se daba sobre todo en pacientes jóvenes y en el grupo de los sGB. Además, los casos que tenían *IDH1m* presentaban una mayor supervivencia libre de progresión (SLP) y una mayor supervivencia global (SG) (Parsons 2008).

*IDH1* es una enzima citosólica implicada en el metabolismo del citrato. La *IDH1m* reduce la actividad enzimática de *IDH1*. Esta reducción provoca una disminución en la producción de  $\alpha$ -cetoglutarato, reduciendo, así, la degradación de HIF-1 y, en consecuencia, promoviendo el crecimiento tumoral y la angiogénesis. Por otro lado, la reducción de la actividad enzimática de *IDH1* aumenta la producción de D-2-hidroxiglutarato, lo que, en última instancia, altera la metilación del ADN e induce el denominado perfil hipermetilador de los gliomas (G-CIMP, del inglés *Glioma CpG Island Methylator Phenotype*) (ver más adelante) (Waitkus 2016) (Figura 7).



**Figura 7:** Alteraciones celulares asociadas a la IDHm. En esta imagen se observa el doble mecanismo oncogénico relacionado con la IDHm: por un lado, la disminución en la degradación de HIF-1 y, por otro, la hipermetilación del ADN (Waitkus 2016)

Entre el 2 y el 5% de los GI (sobre todo OIII) tiene mutado el gen *IDH2* (*IDH2m*), otra isoenzima de IDH, en este caso de localización mitocondrial. Las *IDH1m* e *IDH2m* son mutuamente excluyentes (Arita 2015).

Las *IDHm* no son exclusivas de los tumores del SNC. Se han descrito *IDHm* en el 10-55% de los casos de condrosarcoma central, colangiocarcinoma intrahepático, leucemia mieloide aguda, linfoma T angioinmunoblástico, melanoma maligno y carcinoma anaplásico de tiroides, entre otros tumores (Ohgaki 2013). Dentro de las neoplasias primarias del SNC, las *IDHm* son prácticamente exclusivas de los GI, y únicamente se han descrito casos esporádicos de astrocitomas pilocíticos, XAP o tumores neuroectodérmicos primitivos (denominados tumores embrionarios en la clasificación de la OMS 2016) con estas alteraciones. Las proliferaciones gliales reactivas tampoco presentan mutaciones de estos genes (Yan 2009). En el grupo de los GI, los gliomas grado II y III muestran *IDHm* con una elevada frecuencia (70-90%), así como también los sGB (85%), mientras que esta frecuencia es baja (5%) en los pGB (Yan 2009).

En los GI, las *IDH1m* afectan al codón 132 y en el 90% de los casos corresponden a la mutación p.R132H, en la cual se produce un cambio de aminoácido de una arginina a una histidina en la proteína (IDH1-R132H). Las *IDH2m* afectan al codón 172, siendo la más frecuente la p.R172K (Yan 2009).

El estudio de las *IDHm* se realiza por secuenciación génica (Sanger o pirosecuenciación). No obstante, existen varios anticuerpos comercializados, siendo el más ampliamente empleado el anticuerpo que reconoce la proteína IDH1-R132H (la forma mutada más frecuente). Este anticuerpo puede utilizarse en tejido incluido en parafina y muestra una excelente correlación con la presencia de la mutación por secuenciación (Capper 2009, Kato 2015).

Las *IDHm* constituyen uno de los eventos moleculares más iniciales en el desarrollo de los GI y, como puede observarse en el esquema (Figura 6), se asocian a la codeleción de 1p/19q y a las mutaciones de *CIC* y *FUBP1* en los OD, y a las *TP53m* y *ATRXm* en los tumores astrocitarios. Como se ha mencionado al comentar los GB-IDHm, las *IDHm* se asocian también a la *pMGMTmet*, al perfil hipermetilador (G-CIMP) y al subtipo proneural de la clasificación de los gliomas mediante perfiles de expresión génica (PEG) (ver más adelante) (TCGA 2015). En cambio, los casos de GB con *EGFRa*, *PTENm* o *pTERTm* no muestran prácticamente nunca mutaciones de *IDH* (Huse 2014, Yan 2009).

La determinación de las *IDHm* en las lesiones del SNC constituye, a día de hoy, una herramienta diagnóstica necesaria para la clasificación de todo GI. La OMS obliga a determinar el estado de *IDH* en todos los tipos histológicos y todos los grados de malignidad y a clasificar el caso como *IDHm* o *IDHwt* (Louis 2016) (Figura 1). Para ello, se recomienda el estudio IHQ con el anticuerpo anti-IDH1-R132H, y, en caso de que éste resulte negativo o no concluyente, proseguir el estudio con la secuenciación de *IDH1* y *IDH2*. Únicamente los casos en los que en la secuenciación no se detecten mutaciones podrán catalogarse como GI-IDHwt, con una salvedad: en los casos de GB en pacientes de más de 55 años que no tengan historia de una lesión de menor grado previa (es decir, que no exista sospecha de un sGB) y que no ocupen la línea media (es decir, que no sean sospechosos de corresponder a un GDLM) se podrá hacer el diagnóstico de GB-IDHwt con una tinción para IDH1-R132H negativa, sin necesidad de secuenciar los genes *IDH* (Louis 2016).

La determinación del estado de *IDH* puede constituir una herramienta de gran utilidad también en el DD con otros tipos de gliomas (no infiltrantes) o con procesos no tumorales. Es preciso recordar, sin embargo, que hasta el 10-30% de los casos de glioma de grado II/III y hasta el 90% de los casos de GB pueden no tener *IDHm*, por lo que la ausencia de mutaciones no excluye el diagnóstico de GI.

Las *IDHm* constituyen un factor de buen pronóstico en todos los tipos histológicos y grados de malignidad de los GI (Yan 2009). En el grupo de los gliomas de grado II, la ausencia de

*IDHm* define un grupo de lesiones que, según estudios de PEG, comparten alteraciones moleculares con los GB y presentan un peor pronóstico (TCGA 2015). Entre los gliomas de grado III la situación es similar y desde hace tiempo se sabe que, por ejemplo, los AIII-IDHwt siguen un curso más agresivo que los GB-IDHm (Hartmann 2010). Este es el principal motivo por el cual la actual clasificación de la OMS ha segregado los GI-IDHwt de los GI-IDHm y por el que probablemente en breve se efectúen nuevas actualizaciones que hagan referencia a la gradación de los GI, pues las *IDHm* podrían constituir un factor de grado (Louis 2016).

Aunque las *IDHm* no se consideran, a día de hoy, un factor predictivo de respuesta a tratamiento, en la actualidad se están desarrollando inhibidores de IDH1m y vacunas anti-IDH1m que podrían tener una utilidad terapéutica en los tumores con esta alteración molecular (Rohle 2013, Schumacher 2014).

### **1.2.1.2. Mutación de ATRX**

Las mutaciones de *ATRX* (*ATRXm*) se observan de manera prácticamente exclusiva en los gliomas de estirpe astrocitaria con *IDHm* (Figura 6).

Las *ATRXm* se describieron por primera vez en tumores neuroendocrinos pancreáticos (Jiao 2011) y, posteriormente, en astrocitomas (Kannan 2012) y GB en edad pediátrica (Schwartzentruber 2012).

El gen *ATRX* (del inglés  *$\alpha$ -Thalassemia/mental Retardation-syndrome-X-linked*), situado en Xq21.1, codifica una proteína nuclear, ATRX, que ayuda a mantener la integridad del telómero durante la síntesis del ADN (Clynes 2013). Las *ATRXm* se asocian al denominado alargamiento alternativo de los telómeros (ALT, del inglés *Alternative Lengthening of Telomeres*), uno de los mecanismos que utilizan las células neoplásicas para asegurar su inmortalidad (Heaphy 2011).

Como puede observarse en la Figura 6, las *ATRXm* se correlacionan con las *IDHm* y *TP53m* y son mutuamente excluyentes con la codelección de 1p/19q (TCGA 2015). Así, esta alteración se observa de manera prácticamente específica en los tumores de estirpe astrocitaria. Entre los astrocitomas, los AII, los AIII y los sGB tienen *ATRXm* en aproximadamente el 60-70% de los casos, mientras que esta alteración es muy infrecuente (4%) en los pGB (Jiao 2012).

La gran mayoría de las mutaciones detectadas hasta la fecha truncan la proteína y reducen su concentración, por lo que la pérdida de expresión IHQ de ATRX se ha constituido como la estrategia diagnóstica de elección para la de detección de la *ATRXm* en la práctica clínica diaria (Tanboon 2016). No obstante, conviene recordar que la IHQ para ATRX es especialmente sensible a la calidad del material tisular, fundamentalmente a las condiciones de fijación (Wiestler 2013).

Las *ATRXm* constituyen un marcador diagnóstico de gran utilidad en el DD entre, por ejemplo, un astrocitoma pilocítico (sin *ATRXm*) y un AD (con *ATRXm*), o entre un AD y un OD (sin *ATRXm*). La actual clasificación de la OMS considera la pérdida de la expresión IHQ de ATRX como un marcador característico, pero no necesario para la clasificación de un GI como un tumor astrocitario (Louis 2016).

Algunos estudios apuntan que las *ATRXm* constituirían un factor de buen pronóstico en los gliomas con *IDHm* (Wiestler 2013), mientras que otros trabajos no han conseguido reproducir estos resultados (Liu 2012). No existe evidencia hasta la fecha del valor predictivo de las *ATRXm* en gliomas, aunque su asociación al ALT sugiere que los casos mutados podrían ser susceptibles a futuros tratamientos con inhibidores de la proteína cinasa ATR (Flynn 2015).

### **I.2.1.3. Mutación de TP53**

Las mutaciones de *TP53* (*TP53m*) se observan de manera prácticamente exclusiva en los gliomas de estirpe astrocitaria (Figura 6).

*TP53* es uno de los genes más frecuentemente mutados en las diferentes neoplasias humanas (Petitjean 2007). La forma mutada de la proteína p53 contribuye a la oncogénesis por diversos mecanismos, como la incapacidad de inducir el arresto del ciclo celular o la apoptosis en células que han adquirido mutaciones deletéreas o muestran una inestabilidad genética aumentada (Muller 2013).

En los AD, *TP53* está inactivado bialélicamente, bien por mutación de un alelo seguido de recombinación mitótica, bien por duplicación del alelo mutado, o por mutación de los dos alelos (Suzuki 2015).

Más del 50% de los AII, los AIII y los sGB tienen *TP53m*, siendo esta alteración menos frecuente en los OD y los pGB (Yan 2009). Los GBCG muestran *TP53m* en la práctica totalidad de los casos (Meyer-Puttlitz 1997).

Las *TP53m* se asocian a las *IDHm* y *ATRXm* y son mutuamente excluyentes con la codeleción de 1p/19q (TCGA 2015).

La proteína p53 mutada tiene una vida media superior a la forma no mutada, motivo por el cual puede detectarse mediante IHQ (Connelly 1992). Únicamente debe valorarse como positiva una tinción intensa en un porcentaje sustancial de células neoplásicas, definida por algunos autores como positividad en más del 50% de las células tumorales (Rodríguez 2008) o en más del 10% de las células tumorales (Takami 2015, Gillet 2014). No obstante, debe tenerse en cuenta que la correlación entre *TP53m* y la inmunotinción para p53 dista de ser exacta (Watanabe 1997).

En la actualidad, el estudio de la expresión proteica de p53 se utiliza únicamente con fines diagnósticos y constituye uno de los marcadores de elección en el DD entre un AD y una proliferación astrocitaria reactiva (Yaziji 1996). De igual modo que con el estudio de *ATRXm*, la actual clasificación de la OMS considera *TP53m* como un rasgo característico de GI de estirpe astrocitaria, pero no necesario para el diagnóstico (Louis 2016).

Sobre el papel pronóstico de *TP53m*, diferentes estudios lo han considerado como un marcador de buen o de mal pronóstico (Birner 2002, Soini 1994), mientras otros defienden que no existiría asociación entre las alteraciones de p53 y la supervivencia (Newcomb 1998). Las *TP53m* no constituyen un marcador con valor predictivo de respuesta a tratamiento.

### ***1.2.1.4. Codeleción de 1p/19q y mutaciones en CIC y FUBP1***

La codeleción de 1p/19q es, por definición, una característica propia y exclusiva de los OD, tal y como establece la actual clasificación de la OMS (Louis 2016) (Figuras 1 y 6).

La codeleción de 1p/19q constituye la pérdida completa (de todo el brazo) y combinada (a la vez) del brazo corto del cromosoma 1 (1p) y el brazo largo del cromosoma 19 (19q). Este fenómeno se produce como consecuencia de una translocación no balanceada entre estos cromosomas, con pérdida posterior de uno de los cromosomas híbridos (el que contiene 1p y 19q) (Jenkins 2006). La mayoría de los OD con codeleción de 1p/19q (60%) tienen mutaciones en el gen *CIC* (un ortólogo del gen *capicúa* de *Drosophila*, situado en 19q) y en

menor grado (29%) en *FUBP1* (situado en 1p). Estas mutaciones son específicas de los casos con codeleción 1p/19q (TCGA 2015).

La codeleción de 1p/19q se asocia a las *IDHm* y a las *pTERTm*, y existe una correlación inversa entre la misma y las *TP53m* y *ATRXm* (TCGA 2015).

El estudio de 1p/19q puede realizarse por diferentes técnicas, de las cuales las más empleadas son el análisis de la pérdida de heterocigosidad mediante estudio de microsatélites y la hibridación *in situ* fluorescente (FISH).

La codeleción de 1p/19q constituye una herramienta diagnóstica, pronóstica y predictiva de respuesta a tratamiento en el contexto de los OD (Weller 2012).

Puesto que el presente trabajo versa sobre el GB, que por definición es un tumor astrocitario desprovisto de las alteraciones moleculares propias del OD, no nos extenderemos más en este apartado.

### ***1.2.2. Principales alteraciones moleculares más propias de los GB***

De todas las alteraciones moleculares más propias de los GB (las que aparecen en la Figura 6 como alteraciones propias del GB-IDHwt), se detallarán a continuación únicamente aquellas que tienen una mayor relevancia clínica. El resto de alteraciones se comentarán más superficialmente al analizar las principales vías de señalización celular que se encuentran alteradas en el GB.

#### ***1.2.2.1. Metilación del promotor de MGMT***

La metilación del promotor de *MGMT* (*pMGMT*) se observa en los GI de todos los tipos histológicos y todos los grados de malignidad (a pesar de que, en un intento de simplificación, únicamente consta en la Figura 6 en relación a los GB-IDHwt).

La *MGMT* (O6-metilguanina-ADN-metiltransferasa) es una enzima que repara el daño citotóxico producido por los agentes alquilantes. La hipermetilación del promotor de *MGMT* (*pMGMTmet*) provoca el silenciamiento del gen, con la consiguiente reducción de la concentración de esta enzima y un aumento de la sensibilidad a la quimioterapia (QT) con agentes alquilantes como las nitrosoureas o TMZ (Esteller 2000).

La *pMGMTmet* ocurre en aproximadamente el 35-50% del total de los GB y es más frecuente entre los sGB (75%) que entre los pGB (45%). En el resto de grupos de GI (grados II y III) las frecuencias oscilan entre el 40 y el 70%, siendo más alta en los OD que en los astrocitomas (Weller 2010). Una vez más, esta alteración molecular no es exclusiva de los GI, y puede observarse también en neoplasias extraneurales, como el carcinoma de pulmón, riñón o vejiga urinaria (Esteller 1999).

La *pMGMTmet* se relaciona con las *IDHm* y, por ello, es más frecuente en los sGB y en los gliomas de grado II/III. En los gliomas con *IDHm*, la *pMGMTmet* se encuentra íntimamente ligada al hecho de que estos tumores son de fenotipo G-CIMP y muestran metilación en un amplísimo número de genes, incluyendo *MGMT*. Así, hasta el 85% de los GI con *IDHm* y sin codeleción de 1p/19q tienen *pMGMTmet*, mientras que esta cifra alcanza aproximadamente el 100% en los tumores con codeleción (Ceccarelli 2016). En los pGB la *pMGMTmet* se produciría por un mecanismo aún desconocido, pero diferente de la existencia de un fenotipo hipermetilador (Bady 2012).

Existen diferentes técnicas que interrogan el estado del *pMGMT*, cada una de ellas con sus ventajas e inconvenientes. Las técnicas más frecuentemente utilizadas, y las más recomendadas para la práctica clínica diaria, son la PCR específica de metilación (MSP, del inglés *Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction*) y la pirosecuenciación (también específica de metilación) (Weller 2010). Existen anticuerpos comercializados para el estudio IHQ de *MGMT*, pero no se ha encontrado una correlación entre la expresión proteica y la metilación del gen o la respuesta al tratamiento QT (Balaña 2011, Preusser 2008).

El conocimiento del estado del *pMGMT* no aporta valor al diagnóstico histológico, pero sí constituye un marcador pronóstico y predictivo de respuesta al tratamiento con radioquimioterapia en el grupo de los GB.

La *pMGMTmet* es un factor de buen pronóstico en todos los tipos histológicos y todos los grados de malignidad de GI. En los gliomas de grado II y III, y en los sGB, este hecho probablemente se deba a su relación con las *IDHm* y con el fenotipo G-CIMP. En los GB-*IDHwt* la *pMGMTmet* constituye un factor pronóstico independiente (Wick 2013).

Dos ensayos clínicos en población anciana con GB (definida según los diferentes autores como pacientes con más de 65 o de 70 años) han constatado que aquellos que tienen tumores con *pMGMTmet* muestran mayor SG cuando se tratan con TMZ, en tanto que los que no tienen metilación presentan supervivencias más largas cuando se tratan con RT

(Wick 2009, Malmstrom 2012). Así pues, el conocimiento del estado del *pMGMT* puede ayudar a la toma de decisiones terapéuticas en ancianos con GB, que son pacientes más frágiles en los que el tratamiento combinado con RT y QT no siempre es factible. En el resto de pacientes, y aunque la *pMGMTmet* es un marcador predictivo de respuesta a la radioquimioterapia, el tratamiento combinado con RT y TMZ es la norma y, tal y como se constató en el estudio EORTC/NCIC 26981/22981, los pacientes con tumores *pMGMTnomet* también se benefician, aunque en menor medida, de añadir TMZ al tratamiento con RT (Stupp 2005). Por ello, la determinación del estado del *pMGMT* no es necesaria, a día de hoy y según la mayoría de los autores, para la toma de decisiones terapéuticas en los pacientes no ancianos con GB. Cabe mencionar aquí, únicamente a modo de apunte, que los estudios de PEG en GB han sugerido que la *pMGMTmet* constituiría un factor predictivo de respuesta únicamente en el subtipo clásico de GB (ver más adelante) (Brennan 2013).

### **1.2.2.2. Alteraciones en EGFR**

Las alteraciones en *EGFR* se encuentran prácticamente limitadas a los GI de alto grado, predominantemente al grupo de los GB (Figura 6).

Más del 40% de los GB presentan amplificación de *EGFR* (*EGFRa*) (Burger 2001, Ohgaki 2007) y el 50% de los casos con *EGFRa* muestran una variante de *EGFR*, la denominada variante III (*EGFRvIII*), que se caracteriza por la delección de una porción del gen (del exón 2 al exón 7) que, en última instancia, resulta en una proteína con actividad constitutiva, independiente de su unión a ligando (Aldape 2004, Sugawa 1990).

La *EGFRa* es una alteración más propia de los pGB y su frecuencia en sGB es muy baja (8%), siendo relativamente frecuente en los GBCP (70-83%) y rara en los GS y los GBCO (0-6%) (Karsy 2012). De igual modo, la *EGFRvIII* es más prevalente entre los GBCP que entre el resto de GB (Perry 2004). Los gliomas de menor grado (II y III) muestran alteraciones de *EGFR* con una frecuencia inferior al 3% y la mayoría de los tumores que las tienen son IDHwt y presentan otras alteraciones moleculares más propias de los GB, concretamente de los pGB (TCGA 2015).

Las alteraciones de *EGFR* pueden verse en otras neoplasias, como por ejemplo en el adenocarcinoma de pulmón, pero las alteraciones que afectan a *EGFR* en el GB, como la *EGFRa* a altos niveles (con más de 20 copias del gen) o las alteraciones en el dominio extracelular (*EGFRvIII*), son diferentes a las que se observan en las neoplasias no gliales (Jänne 2005).

La *EGFRa* suele analizarse mediante FISH. La determinación IHQ del aumento de la expresión de la proteína (EGFR) no se recomienda en el caso de los GI por la dificultad en la interpretación de los resultados y porque no existe una buena correlación entre la expresión proteica y el resultado de la FISH (Dei Tos 2005, Kersting 2006). Para detectar la forma *EGFRvIII* puede estudiarse los transcritos de ARN generados como consecuencia de la deleción, mediante RT-PCR (del inglés *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) o puede analizarse su expresión IHQ con el uso de anticuerpos específicos (Aldape 2004). Según diferentes autores, la correlación entre estas dos aproximaciones es aceptable (Wikstrand 1995).

El estudio de la *EGFRa* puede ser de gran ayuda en el DD histológico entre un OIII y un GBCP, o entre un GB y un AD de menor grado (principalmente un AIII-IDHwt). En ambos casos, la presencia de *EGFRa* favorecería el diagnóstico de GB (Masui 2016). La presencia de *EGFRvIII* es una alteración que únicamente presentan las células neoplásicas y, entre las neoplasias, es prácticamente específica del GB (Maire 2014).

La relevancia pronóstica de la *EGFRa* en los GB es un tema muy debatido, aunque la mayoría de los autores coinciden en que no parece constituir un factor pronóstico, quizás por su estrecha relación con el propio diagnóstico de GB (Horbinski 2011, Chen 2015). Algunos trabajos defienden que el poder pronóstico de la *EGFRa* dependería de la edad, siendo un factor de mal pronóstico en los pacientes jóvenes y de buen pronóstico en los ancianos (Smith 2001). En cuanto al papel pronóstico de *EGFRvIII*, también existen diferentes opiniones en la literatura. Algunos autores describen que la presencia de la *EGFRvIII* se asocia a una disminución de la SG en los pacientes con GB (Heimberger 2005, Jeuken 2009), mientras que otros afirman que no existirían diferencias en SG entre los pacientes con y sin *EGFRvIII* (Chen 2015).

Quizás el mayor interés clínico de las alteraciones de *EGFR* en GI sería su papel potencial como biomarcador predictivo de respuesta a terapias dirigidas. En ese contexto, los inhibidores de las tirosín-cinasas no han demostrado, hasta la fecha, una utilidad terapéutica en los pacientes con GB que presentan alteraciones de *EGFR* (Kesari 2005, Rich 2004). Existen, sin embargo, vacunas contra *EGFRvIII* que han conseguido resultados prometedores en estudios preliminares (Schuster 2015).

### 1.2.2.3. Mutación del promotor de *TERT*

Las mutaciones del promotor de *TERT* (*pTERTm*) constituyen un hallazgo característico de los OD y de los pGB (Figura 6).

La inmortalidad celular se ha considerado históricamente como una característica propia de los tumores malignos. Esa inmortalidad ha atraído mucha atención en los últimos años con el descubrimiento de alteraciones en el gen *TERT* (del inglés *Telomerase Reverse Transcriptase*). Estas alteraciones provocarían, en última instancia, una sobreexpresión de la proteína TERT, con el consiguiente mantenimiento de la longitud de los telómeros, que en condiciones normales se acortan con cada ciclo de división celular. La gran mayoría de las neoplasias humanas expresan altos niveles de TERT (Ducrest 2002).

Aunque se han descrito mutaciones del gen *TERT* y variaciones en el patrón de metilación de su promotor, la alteración más frecuente es la mutación somática del promotor del gen (*pTERTm*), presente en melanomas, liposarcomas, carcinomas de tiroides y de vejiga, hepatocarcinomas y diferentes tumores del SNC (Aldape 2015).

Entre los tumores del SNC, *pTERTm* se observa principalmente en los GI, aunque también, y con menor frecuencia, enependimomas, meduloblastomas del adulto y meningiomas (Killela 2013, Koelsche 2013).

El porcentaje de casos con mutaciones varía según el tipo histológico y el grado de malignidad, pero representa el 60% de todos los casos de glioma, con lo que constituye el gen más frecuentemente mutado en los GI (Eckel-Passow 2015). Tienen mayores niveles de *pTERTm* los GB (entre el 50-75%) y los OD, sean de grado II o III (aprox. 75%), que los AII o los AIII (32% y 25%, respectivamente). Este hecho podría explicarse por la existencia de *ATRXm* en este último grupo, otro mecanismo implicado en el mantenimiento de la longitud de los telómeros como ya hemos explicado. Es por ello también que, entre los GB, los pGB muestran frecuencias de *pTERTm* superiores a los secundarios (70-80% y 5-28% según diferentes series, respectivamente) (Koelsche 2013, Nonoguchi 2013).

Por todo lo mencionado anteriormente es fácil entender que las *pTERTm* se correlacionan de manera directa con la codeleción de 1p/19q en los OD, e inversamente con las *ATRXm* y *TP53m* en los AD (Koelsche 2013).

La determinación de la *pTERTm* puede hacerse mediante secuenciación, ya que en la mayoría de los casos la mutación se produce en uno de dos puntos de máxima frecuencia (*hot spots*) que, además, son mutuamente excluyentes (Huang 2013). Existen anticuerpos comercializados que permiten detectar la expresión IHQ de TERT, pero los estudios publicados a este respecto, aunque escasos, parecen indicar una baja sensibilidad de la técnica (Vinagre 2013).

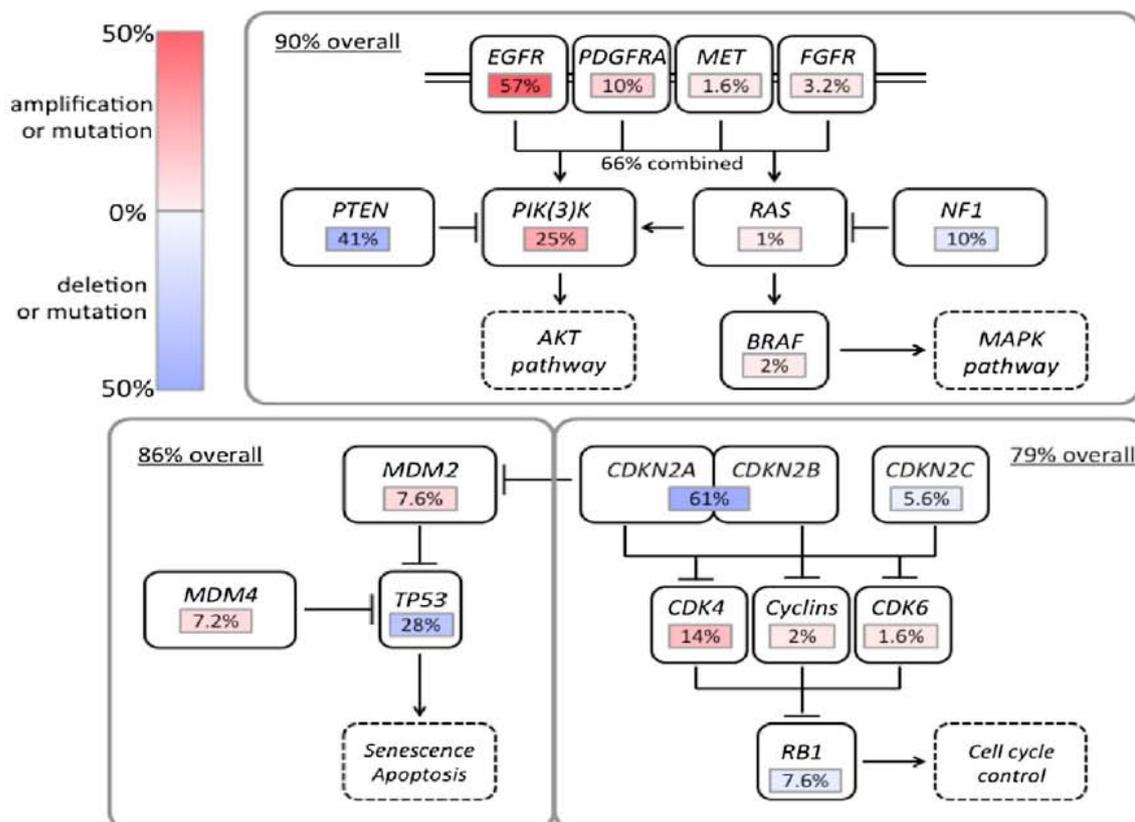
El estudio de la *pTERTm* puede constituir un factor útil en el diagnóstico de los GI en circunstancias especiales, como en la distinción entre un OD (sobre todo en casos sin codeleción de 1p/19q) y un tumor astrocitario de bajo grado, favoreciendo el diagnóstico de OD en caso de *pTERTm*. Puede también ser de ayuda en la distinción entre un AIII-IDHwt y un GB-IDHwt, favoreciendo esta segunda opción (Masui 2016).

La *pTERTm* parece tener un valor pronóstico en GB-IDHwt. En un trabajo publicado recientemente, los autores proponen un algoritmo pronóstico para los casos de GB en base a las alteraciones de *TERT*, *EGFR* e *IDH1*, donde el peor pronóstico lo conferiría la presencia de *pTERTm* (Labussière 2014). No existe evidencia hasta la fecha del valor predictivo de la *pTERTm* en gliomas.

### **1.2.3. Principales alteraciones de las vías de señalización en GB**

El TCGA (del inglés *The Cancer Genome Atlas*) es una iniciativa conjunta del Instituto Nacional de Cáncer y del Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano cuyo objetivo es crear un atlas de las principales alteraciones moleculares que subyacen a los diferentes tipos de neoplasia. En 2008 el TCGA publicó los resultados del análisis genómico (en términos de alteraciones en la secuencia y la metilación génica, así como en el número de copias de ADN) de 206 casos de GB. Este trabajo sirvió para reafirmar un concepto ya conocido: la mayor parte de las alteraciones moleculares que subyacen a los GB se concentran principalmente en tres vías de señalización. Estas vías son la de RTK/RAS/PI3K, la de p53 y la de retinoblastoma (RB), que se ven alteradas con una frecuencia del 88, 87 y 78%, respectivamente. En cada vía de señalización los diferentes componentes muestran frecuencias distintas y diferente tipo de alteraciones (TCGA 2008).

Estos datos han sido ampliados recientemente a una serie mayor de casos (543 GB), obteniéndose unos resultados similares (Brennan 2013) (Figura 8).



**Figura 8:** Principales alteraciones genéticas (naturaleza y frecuencia) en las tres vías de señalización más implicadas en el GB. (En rojo se marcan las alteraciones activadoras y en azul las inactivadoras) (Brennan 2013)

Como se observa en el esquema anterior, la mayor parte de los GB muestran una alteración en la vía de p53 (86% de los casos) y de RB (79% de los casos), bien por mutación o por alteración en el número de copias de ADN. Estas alteraciones no afectan únicamente a *TP53* y a *RB1*, sino que también se observan delecciones en los principales activadores (como *CDKN2A*) o amplificaciones en los represores más importantes (como *CDK4* o *MDM2*) de estas vías. Además de los circuitos supresores, los GB también muestran activación de las vías oncogénicas, como las que afectan a los receptores de las tirosín-cinasas (RTK). Hasta el 57% de los casos muestran *EGFRa* y el 10% amplificación de *PDGFRA* (*PDGFRAa*). Aunque menos frecuente, también se ha descrito la amplificación de *MET*. Un mismo caso de GB puede mostrar alteraciones en diferentes RTK, habitualmente en diferentes subpoblaciones tumorales (Snuderl 2011). La mayoría de los GB presentan activación de las vías PI3K-AKT-mTOR y RAS-MAPK. Estas alteraciones incluyen mutaciones en los genes que codifican PIK3 (*PI3KCA* y *PI3KR1*) así como delecciones o mutaciones silenciadoras en *PTEN*. El 15-40% de los GB muestran mutaciones de *PTEN* y esta alteración es prácticamente exclusiva de los pGB, siendo muy infrecuente (alrededor del 5%) en los sGB. Las delecciones homocigotas de *PTEN* son muy infrecuentes en los GB (menos del 2% de

los casos), así como también es infrecuente la represión por alteraciones epigenéticas o por regulación por miRNA, fenómenos todos ellos que sí se describen en los gliomas de menor grado (Aldape 2015). Un hallazgo importante de este trabajo fue la descripción de mutaciones del gen *NF1* en casos de GB esporádicos, y no sólo en aquellos gliomas asociados a la neurofibromatosis tipo 1.

### **I.3. Subtipos transcriptómicos y epigenómicos de GB**

#### ***I.3.1. Perfiles de expresión génica en GB***

La aplicación de plataformas de análisis masivo de casos con micromatrices (*microarrays*) de expresión, una tecnología disponible desde finales de 1990, ha permitido identificar patrones o perfiles de expresión génica (PEG) y codificarlos en subtipos tumorales, dentro de los tipos histológicos ya establecidos, en un gran número de neoplasias humanas.

Los primeros estudios de PEG en gliomas se centraron en establecer los correlatos moleculares de grupos tumorales diferentes, definidos clínica y/o morfológicamente, tales como tumores con diferentes grados de malignidad de la OMS, pGB frente sGB, o tumores astrocitarios frente a oligodendrogliales (Kim 2002, Rickman 2001, Shai 2003). Estudios posteriores han permitido identificar perfiles moleculares distintivos en el grupo de los GI y subtipos específicos de PEG dentro del grupo concreto de los GB (Freije 2004, Li 2009, Phillips 2006, Verhaak 2010).

En el año 2006, Philips y col (Phillips 2006) analizaron la expresión diferencial de 35 genes relacionados con el curso clínico de la enfermedad en una serie de 76 gliomas de alto grado (III-IV) y describieron tres subtipos transcriptómicos de gliomas de alto grado: el subtipo proneural (PRN-Ph), el proliferativo (PRL-Ph) y el mesenquimal (MES-Ph). En este trabajo, los autores resaltan que estos tres subtipos presentan diferentes características clínicas, morfológicas y moleculares. Así, en su serie, la mayor parte de los gliomas de grado III y de los GB sin necrosis, así como los tumores con un componente oligodendrogliar, pertenecían al subtipo PRN-Ph. Los pacientes con gliomas PRN-Ph tenían una edad media inferior (40 años) y mostraban una supervivencia superior a los de los otros dos subtipos. Son marcadores de tumores PRN-Ph *Olig2*, *DLL3* y *BCAN*; de tumores PRL-Ph *PCNA* y *TOP2A*; y de tumores MES-Ph, *CHI3L1/YKL40*, *CD44* y *VEGF*. En los gliomas PRN-Ph no se observaban alteraciones en *PTEN* ni *EGFR* y la vía de señalización desregulada en estos

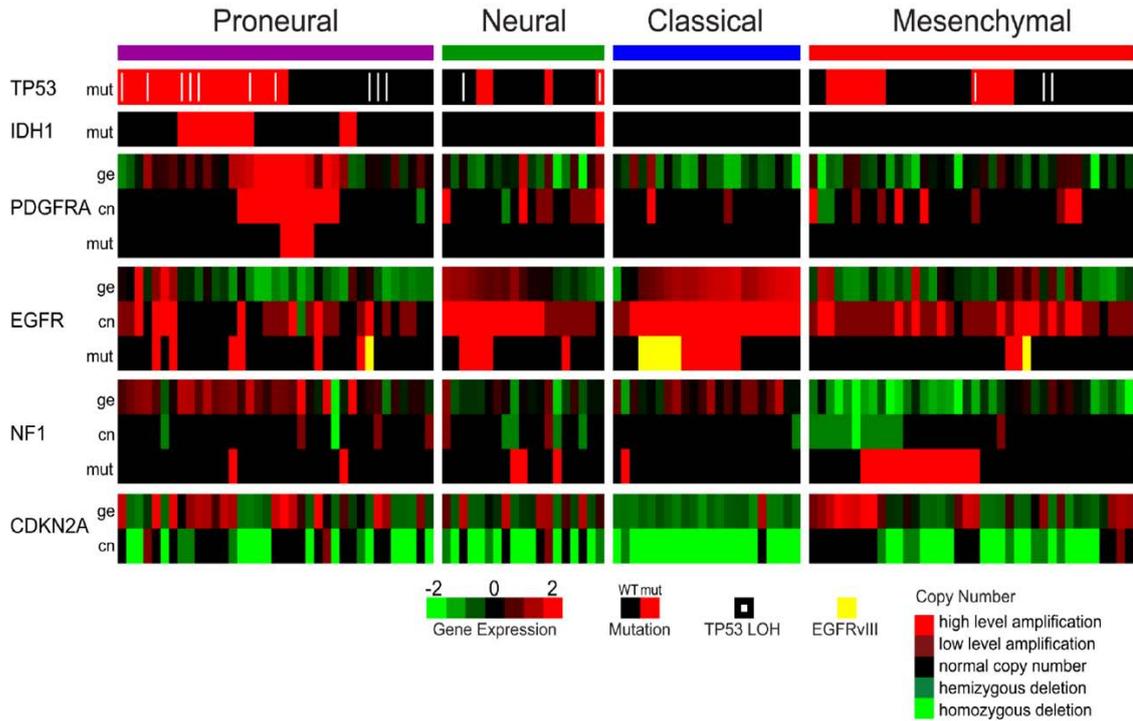
casos era la vía Notch-Sonic-Hedgehog. Los casos PRL-Ph y MES-Ph mostraban pérdida de *PTEN* y podían tener *EGFRa*. La principal vía de señalización alterada era la vía de AKT en ambos casos y los pacientes con GB de subtipo MES-Ph presentaban la supervivencia más baja de toda la serie. Phillips y col describieron la existencia de un paralelismo entre los 3 subtipos de GB y las diferentes fases de la neurogénesis (de ahí el nombre para cada uno de ellos). El subtipo PRN-Ph se asemejaba al estado de neurona madura, el PRL-Ph al de célula “en tránsito” y el MES-Ph a la célula madre neural. Además, los tumores PRN-Ph y PRL-Ph podían, en la recidiva, evolucionar a un subtipo MES-Ph (Figura 9).

<b>A</b>	<b>Proneural</b>	<b>Proliferative</b>	<b>Mesenchymal</b>
Histological grade	WHO grade III or WHO grade IV with or without necrosis	WHO grade IV with necrosis	WHO grade IV with necrosis
Cellular morphology	Astrocytic or Oligodendroglial	Astrocytic	Astrocytic
Evolution of signature	Arises in 1° tumor, may persist or convert to Mes	Arises in 1° tumor, may persist or convert to Mes	Arises in 1° tumor or by conversion from other subtype
Patient age	Younger (~40 yrs.)	Older (~50 yrs.)	Older (~50 yrs.)
Prognosis	Longer survival	Short survival	Short survival
Histological Markers	Olig2, DLL3, BCAN	PCNA, TOP2A	CHI3L1/YKL40, CD44, VEGF
Tissue similarities	Adult and Fetal Brain	HSC, lymphoblast	Bone, cartilage, smooth musc, endothelium, dendritic cells
Biological process	Neurogenesis	Proliferation	Angiogenesis
Analogous forebrain cell	Neuroblast	Neural Stem Cell and/or Transit Amplifying Cell	Neural Stem Cell
Chromosome gain/loss	None	Gain of 7 & Loss of 10 or 10q	Gain of 7 & Loss of 10
PTEN locus	PTEN intact	PTEN loss	PTEN loss
EGFR locus	EGFR normal	EGFR amplified or normal	EGFR amplified or normal
Signaling	Notch activation	Akt activation	Akt activation

**Figura 9:** Principales características de los tres subtipos de GB según Phillips y col (Phillips 2006)

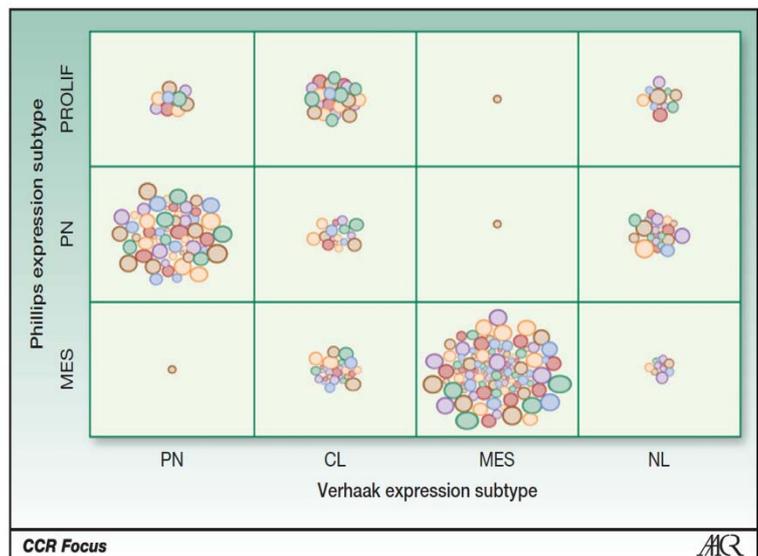
Un segundo trabajo relevante en este campo fue el publicado en 2010 por Verhaak y col, en el contexto del proyecto del TCGA (Verhaak 2010). En este caso se analizó la expresión de 840 genes diferentes, no elegidos previamente por su poder pronóstico, en 200 casos de GB. Empleando una metodología similar a la utilizada por Phillips y col (de agrupamiento por *consensus clustering*), estos autores describieron cuatro subtipos transcriptómicos de GB: proneural (PRN-Vk), neural (NEU-Vk), clásico (CLS-Vk) y mesenquimal (MES-Vk), y correlacionaron estos subtipos con alteraciones en el número de copias y en las mutaciones somáticas de un grupo determinado de genes (Figura 10). El subtipo PRN-Vk

mostraba *TP53m*, *IDH1m* y *PDGFRAa*. Además, este subtipo de GB presentaba un aumento de la expresión de genes asociados al desarrollo de los oligodendrocitos, como *PDGFRA*, *NKX2-2*, *SOX2* y *OLIG2*. El subtipo NEU-Vk se caracterizaba por la expresión de marcadores neuronales como *NEFL*, *GABRA1*, *SYT1* y *SLC12A5*. Las alteraciones de *EGFR*, en forma de *EGFRa* y *EGFRvIII*, y la delección de *CDKN2A* eran propias del subtipo CLS-Vk, con expresión elevada, pues, de *EGFR* y expresión baja de *p16INK4A*. Los marcadores de célula madre neural, como *NES*, así como los componentes de la vía de señalización Notch-Sonic-Hedgehog, eran muy prevalentes entre los tumores de este subtipo. Por último, los GB del subtipo MES-Vk presentaban mutaciones en *NF1*, *TP53* y *PTEN* y altos niveles de expresión de *YKL-40*, *MET*, *CD44* y *MERTK*. Verhaak y col describieron que determinados patrones morfológicos de GB se relacionan con los diferentes subtipos transcriptómicos: el GBCO con el subtipo PRN-Vk, el GBCP con el CLS-Vk y el GS con el MES-Vk. En el estudio del TCGA los GB de subtipo PRN-Vk presentaban un mejor pronóstico. Este hecho (también observado en la serie de Phillips y col) se ha atribuido, posteriormente, a la alta asociación entre el subtipo PRN y las *IDHm*, un factor de reconocido buen pronóstico en GB. De hecho, se ha demostrado que los GB subtipo PRN que no tienen *IDHm* no presentan un pronóstico mejor que el resto de los subtipos de GB (Brennan 2013). El GB PRN-Vk era el único subtipo que no se beneficiaba de un tratamiento intensivo con QT (definido como QT y RT concurrente o más de 3 ciclos de QT), aunque hay que tener en cuenta que se trata de un estudio retrospectivo. En esta misma línea, y en base a la elevada expresión de genes relacionados con la angiogénesis en el subtipo MES-Vk, Verhaak y col postulaban que este grupo de GB podría beneficiarse del tratamiento con factores antiangiogénicos. No obstante, el análisis de los datos moleculares de los pacientes incluidos en el ensayo AVAGLIO (de inglés *Avastin in GB*), que exploraba la eficacia de añadir bevacizumab al tratamiento estándar con RT y TMZ, ha revelado que sería el grupo de GB subtipo PRN sin *IDHm* el único que se beneficiaría de esta estrategia terapéutica (Sandmann 2015).



**Figura 10:** Principales características moleculares de los cuatro subtipos de GB según Verhaak y col (Verhaak 2010)

Algunos autores han clasificado series de casos de GB utilizando ambos esquemas, el planteado por Phillips y el empleado por Verhaak. En estos trabajos se ha observado que, a pesar de no existir una concordancia del 100%, existe una buena correlación entre los subtipos MES-Ph y MES-Vk (el subtipo más concordante), y los subtipos PRN-Ph y PRN-Vk (Huse 2011) (Figura 11).



**Figura 11:** Comparación entre los esquemas de clasificación transcriptómica del GB de Phillips y Verhaak. La correspondencia es superior en los subtipos mesenquimal (MES) y proneural (PN). El tamaño del círculo representa la intensidad de correspondencia. (MES: mesenquimal, PN: proneural, CL: clásico, NL: neural, PROLIF: proliferativo) (Huse 2014)

Con posterioridad a los estudios de Phillips y Verhaak se han publicado nuevos trabajos que han ampliado el conocimiento sobre las alteraciones moleculares, morfológicas, radiológicas y clínicas de los diferentes subtipos transcriptómicos de GB, preferentemente de los subtipos PRN y MES, que son los más robustos (Brennan 2013, Cooper 2010, Gutman 2013, Joseph 2014, Lv B 2015, Mahabir 2014, Saito 2014, Sonabend 2014).

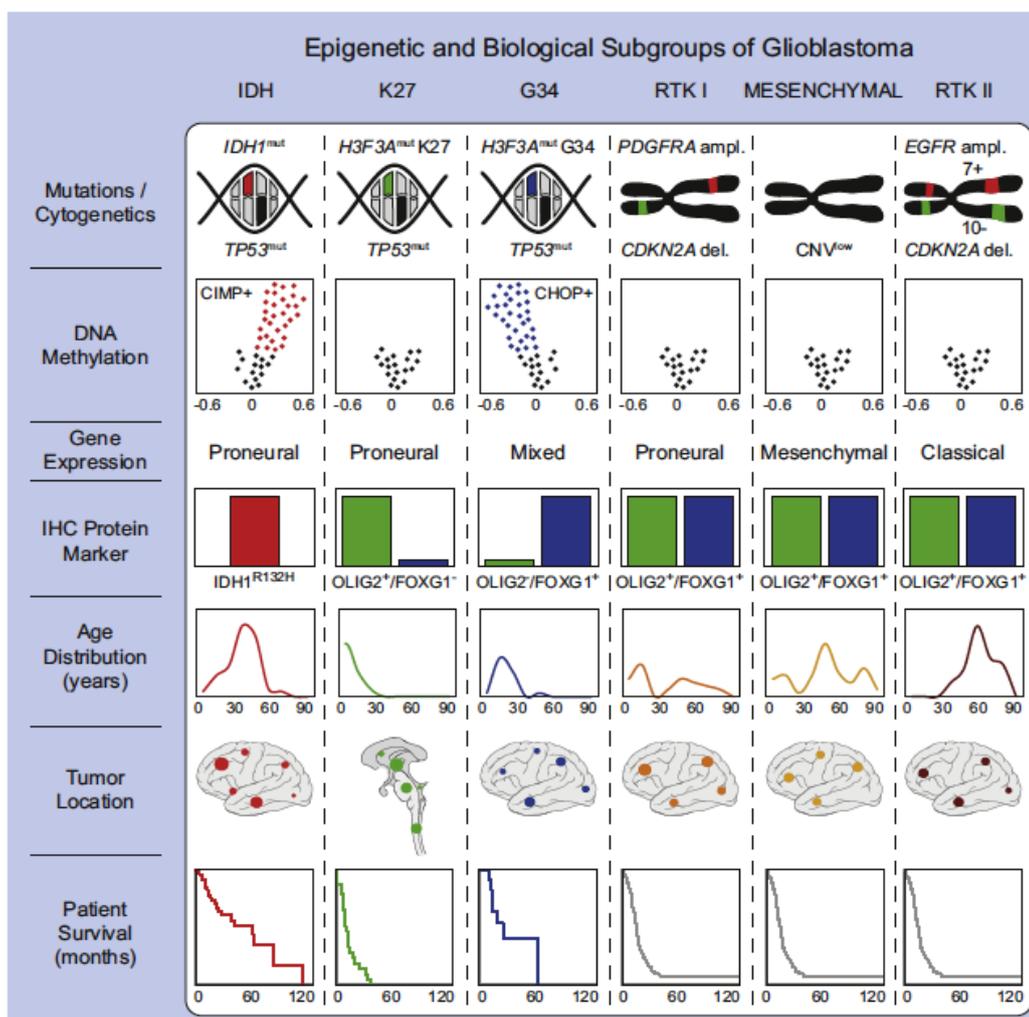
En conclusión, los estudios de PEG en GB han definido subtipos de GB que parecen tener diferente pronóstico y podrían mostrar una respuesta diferente a los tratamientos.

### ***1.3.2. Perfiles de metilación en GB***

En el año 2010, Noushmehr y col, una vez más en el ámbito del TCGA, publicaron la existencia de un subtipo metilador o hipermetilador de GB, el denominado G-CIMP (del inglés *Glioma-CpG Island Methylator Phenotype*), que muestra metilación en las islas CpG de un gran número de genes (Noushmehr 2010). Los casos de GB G-CIMP corresponden en su mayoría (87,5%) a casos del subtipo PRN y se relacionan de manera muy directa con los tumores que presentan *IDHm* (GB-IDHm): todos los casos con *IDHm* son GB G-CIMP y la práctica totalidad de los casos de GB G-CIMP tienen *IDHm*. El perfil G-CIMP es muy prevalente entre los GI de bajo grado (II-III) (45% en los casos de AD y 93% entre los OD) y representa aproximadamente el 8% del total de los casos de GB (Brennan 2013). Los GB G-CIMP presentan una supervivencia superior a los GB subtipo PRN no-G-CIMP y al resto de subtipos transcriptómicos (Noushmehr 2010). Este dato se encuentra en consonancia con la constatación de una mayor supervivencia para los casos de GB subtipo PRN con *IDHm*.

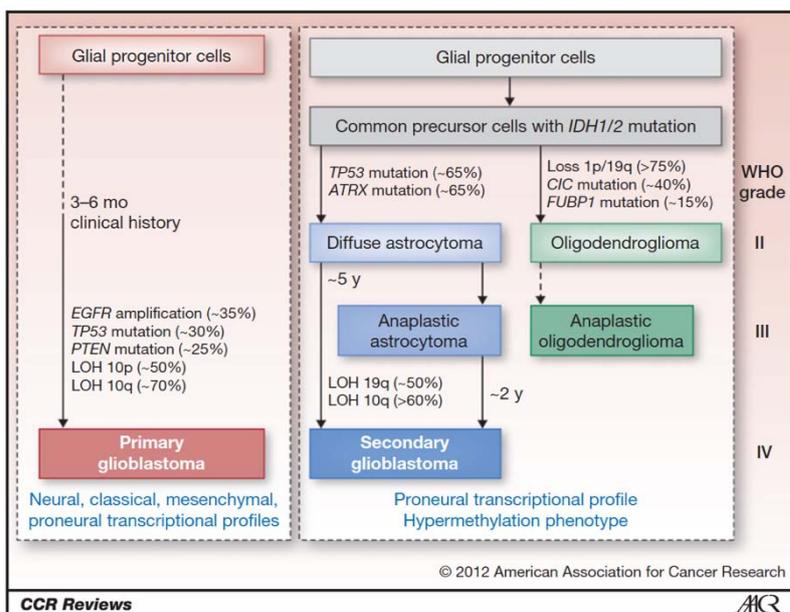
Un segundo trabajo relevante en el campo de la epigenómica es el publicado en 2012 por Sturm y col, que analizó casos de GB en población adulta y pediátrica (Sturm 2012). En este trabajo, que combinaba la información genómica con la epigenómica, se distinguían seis subtipos de GB, cuatro de ellos del subtipo PRN. Dos de estos cuatro subtipos PRN se asociaban a las mutaciones de histona 3 (H3F3) G34 y K27. El tercero correspondía al grupo de GB-IDHm y el último, denominado RTK I, se caracterizaba por sobreexpresión de *PDGFRA* y delección de *CDKN2A*. A los subtipos no PRN los autores los designaron como subtipo RTK II/CLS, caracterizado por *EGFRa* y de nuevo delección de *CDKN2A*, y subtipo MES. Los seis grupos de GB mostraban diferencias en la localización tumoral, la edad de presentación y el pronóstico. Así, de nuevo, únicamente el subtipo GB-IDHm presentó el buen pronóstico inicialmente atribuido a los casos PRN, mientras que los subtipos H3F3 y RTK I, a pesar de ser tumores PRN, tenían el mismo mal pronóstico que

los GB no PRN (Figura 12).



**Figura 12:** Principales características de los seis subtipos de GB según Sturm y col (Sturm 2012)

Los gliomas asociados a mutaciones en H3F3 (entre los que se encuentran los GDLM) son tumores que habitualmente afectan a niños y adolescentes, así que, en un intento de simplificación final, la clasificación por PEG y perfiles de metilación del GB revelaría cuatro o cinco subtipos más o menos bien definidos en la población adulta: los GB PRN G-CIMP, los GB PRN no-G-CIMP, los GB NEU (no presentes en todos los esquemas de clasificación), los GB CLS y los MES. Con todo ello, al esquema de las principales alteraciones moleculares en los diferentes tipos y grados de malignidad de los GI, se ha podido añadir, en los últimos años, esta nueva información tal y como se observa, por ejemplo, en la Figura 13, publicada por Ohgaki y col (Ohgaki 2013).



**Figura 13:** Principales grupos de gliomas infiltrantes y su correlato con los subtipos transcriptómicos y epigenómicos (Ohgaki 2013)

### 1.3.3. Estudios inmunohistoquímicos de PEG en GB

Al igual que en otras áreas de la patología, en el campo de los GI existen trabajos que, con técnicas menos sofisticadas, más económicas y aplicables a tejido incluido en parafina, tratan de reproducir la clasificación de los GI en subtipos de PEG. Todas estas aproximaciones se basan en los datos obtenidos de los estudios de Phillips y de Verhaak que hemos comentados anteriormente (Phillips 2006, Verhaak 2010).

Una de estas aproximaciones ha sido la descrita por Colman y col (Colman 2010) quienes, con el análisis mediante RT-PCR de una batería menor de genes (9, de los cuales dos están relacionados con el subtipo PRN y 7 con el MES), obtienen, para cada uno de los tumores del estudio, un resultado numérico que cataloga el caso como de buen pronóstico (con más carga PRN) o de mal pronóstico (con más MES). Los autores encuentran que existen diferencias significativas en SLP y SG entre los pacientes de ambos grupos. Este esquema de clasificación del GB ha sido utilizado en algunos de los estudios clínicos que ensayan nuevos fármacos para el tratamiento del GB (RTOG0525, RTOG0825).

En 2016, Purkait y col ensayan la clasificación de 114 casos de GB en cuatro subgrupos que denominan tipo PRN, tipo CLS, tipo MES y tipo NEU. Para ello analizan la *EGFRa* y *PDGFRa* (mediante FISH), las *TP53m* y *IDHm* (por secuenciación génica) y la expresión de *NF-1* y *YKL40* (por RT-PCR) y definen cada uno de los subgrupos en base a la presencia o ausencia de estos marcadores (Figura 14). Los autores describen la frecuencia y las diferencias en edad, sexo, localización y SG en sus subgrupos. En su serie, los pacientes con GB PRN

muestran las SG más largas. Cuando segregan estos GB PRN en GB-IDHm y GB-IDHwt, los pacientes con GB-IDHm sobreviven más tiempo que los que tienen tumores PRN IDHwt (Purkait 2016).

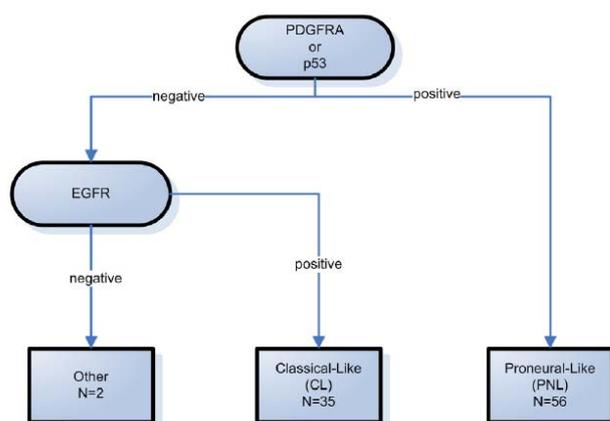
**Table 1** Criteria used for molecular subclassification of GBMs

Molecular subtypes	Criteria used
Classical like (CL)	Presence of EGFR amplification
Proneural like (PN)	Presence of IDH-1 mutation and/or PDGFRA amplification and/or TP53 mutation only, without NF-1/YKL-40 alterations
Mesenchymal like (MES)	Presence of YKL 40 up-regulation and/or NF-1 down-regulation ± TP53 mutation Absence of EGFR/PDGFRA amplification Absence of IDH1 mutation
Neural like (NEU)	Absence of all the above mentioned genetic alterations (EGFR, IDH-1, TP53, PDGFRA, YKL40 and NF-1)

**Figura 14:** Algoritmo de clasificación empleado por Purkait y col para definir los diferentes subgrupos de GB (Purkait 2016)

Cuatro son los principales trabajos publicados que utilizan la IHQ para clasificar los GI en subgrupos de tumores que remedarían los subtipos transcriptómicos descritos (Le Mercier 2012, Motomura 2012, Popova 2014, Conroy 2014). Cabe decir que ninguno de estos cuatro trabajos analiza la expresión génica (PEG) de los casos que incluye en su estudio.

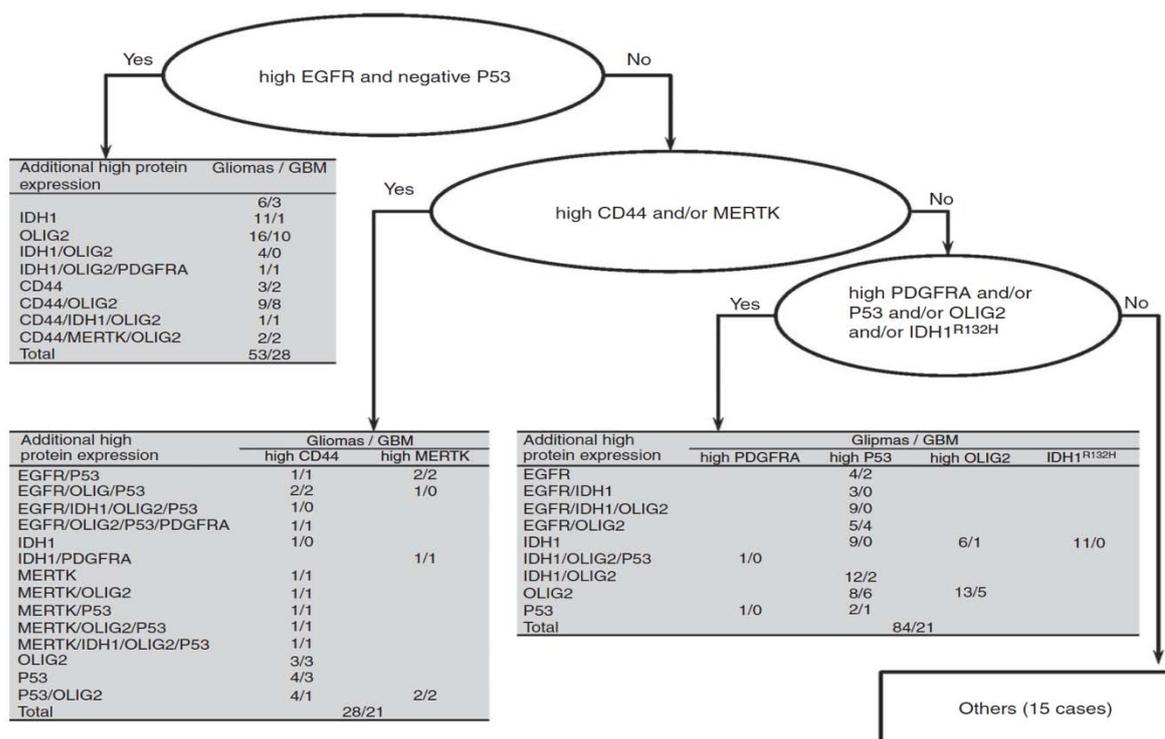
El estudio de Le Mercier (Le Mercier 2012) propone una clasificación de los GB basada en la expresión IHQ de PDGFRA, p53 y EGFR. En su serie de 100 casos de GB, los tumores con expresión de PDGFRA y/o p53 fueron catalogados como GB tipo PRN y los que no mostraban ninguno de estos marcadores, pero sí de EGFR, como GB tipo CLS. El resto fueron catalogados como “otros” (Figura 15). Los autores argumentan que este sistema de clasificación permite definir grupos pronósticos de GB, pues los GB tipo PRN presentaban una supervivencia superior a los GB tipo CLS y esta diferencia se mantenía en los análisis multivariantes. Además, en su serie, los pacientes con GB tipo PRN no parecían beneficiarse de la adición de QT al tratamiento con RT, tal y como ya habían apuntado Verhaak y col con anterioridad (Verhaak 2010).



**Figura 15:** Algoritmo de clasificación empleado por Le Mercier y col para definir los diferentes subgrupos de GB (Le Mercier 2012)

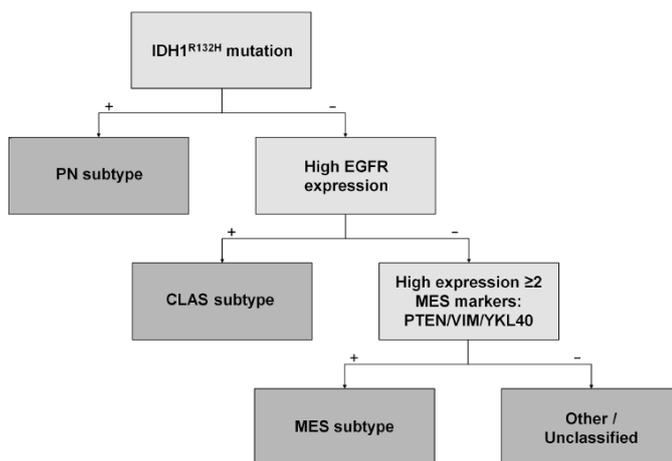
Un segundo trabajo en esta línea es el estudio de Motomura y col, aparecido también en 2012 (Motomura 2012). Los autores clasifican 79 casos de GB en base a la expresión diferencial de 16 marcadores IHQ que escogen a partir de los resultados publicados por Verhaak y col (Verhaak 2010). Los marcadores IHQ empleados en este estudio son Olig2, IDH1-R132H, p53, PDGFRA y PDGFB, como marcadores de subtipo PRN; sinaptofisina, como marcador de subtipo NEU; p16, EGFR, Hes-1 y nestina, como marcadores de subtipo CLS; y VEGF, YKL-40, podoplanina (D2-40) y CD44, como marcadores de subtipo MES. A éstos añaden el análisis de la expresión de PGFA y Ki67. Con el resultado obtenido de la medición de cada uno de estos marcadores en cada uno de los 79 casos de GB, los autores aplican una metodología de *consensus clustering* y describen cuatro subgrupos de GB. Estos cuatro subgrupos los denominan tipo oligodendrocito diferenciado (*DOC*, del inglés *Differentiated Oligodendrocyte*), tipo precursor del oligodendrocito (*OPC*, del inglés *Oligodendrocyte Precursor*), tipo mixto (*Mixed*) y tipo astrocítico mesenquimal (*AsMes*). Establecen un paralelismo entre sus subgrupos y tres de los subtipos de Verhaak (*OPC* con PRN-Vk, *Mixed* con CLS-Vk y *AsMes* con MES-Vk), y encuentran diferencias en supervivencia entre el subgrupo *AsMes* (el supuestamente MES) y el *OPC* (el PRN). Además, definen un patrón histológico diferencial para cada uno de sus subgrupos (este trabajo se comenta con más detenimiento en el apartado de discusión).

Popova y col (Popova 2014) analizan la expresión de EGFR, p53, CD44, MERTK, PDGFRA, Olig2 e IDH1-R132H, utilizando matrices de tejido (TMA), en 180 casos de GI de diferente tipo histológico y diferente grado de malignidad. Los autores clasifican los tumores en tipo PRN, tipo CLS, tipo MES y “otros” según la expresión diferencial de estos marcadores (Figura 16) y describen la frecuencia de estos subgrupos en los diferentes tipos histológicos y los diferentes grados de malignidad. Además, analizan la relación existente entre los diferentes marcadores IHQ entre sí en cada uno de los cuatro subgrupos definidos. Setenta y dos de los 180 casos que incluye el estudio son GB y en este grupo no encuentran ninguna correlación significativa entre las diferentes combinaciones de marcadores IHQ.



**Figura 16:** Algoritmo de clasificación empleado por Popova y col para definir los diferentes subgrupos de GI (Popova 2014) (Los tumores se asignan a un tipo CLS si tienen niveles elevados de EGFR y negatividad para p53, MES si muestran positividad para CD44 y/o MERTK o PRN si tienen PDGFRA, p53, Olig2 o IDH1, tal y como se muestra en la figura)

Por último, el estudio de Conroy y col (Conroy 2014) analiza la expresión proteica de 23 marcadores y la *EGFR* en una serie de 123 casos de GB que también incluyen en TMA. Los autores utilizan un modelo de *consensus clustering* con sólo 10 de los marcadores y describen cuatro subgrupos IHQ/FISH (tipo PRN, tipo CLS, tipo MES y “otros”) que correlacionan con los subtipos transcriptómicos de la literatura. Conroy y col comprueban su estrategia de clasificación con el análisis de la expresión de 9 genes, asociados al subtipo PRN o MES, de manera similar a lo que mencionamos en relación al trabajo de Colman y col. En los 20 casos en que realizan este doble análisis observan una completa concordancia entre los resultados obtenidos con el estudio de los genes (PRN versus MES) y los obtenidos con el estudio IHQ. Finalmente, de los 23 marcadores IHQ iniciales, seleccionan únicamente 5 y establecen un modelo de clasificación en el que la positividad para IDH1-R132 identificaría a los GB tipo PRN, EGFR a los GB tipo CLS y PTEN, VIM y YKL40 a los de tipo MES. Estos autores validan su estrategia en una serie de 44 casos adicionales de GB (Figura 17).



**Figura 17:** Algoritmo de clasificación empleado por Conroy y col para definir los diferentes subgrupos de GB (Conroy 2014)

En resumen, y aunque los diferentes grupos han utilizado diferentes esquemas de clasificación y diversos marcadores, el estudio IHQ de la expresión de determinadas proteínas (inferidas de los estudios de PEG publicados hasta la fecha) parece definir subgrupos de GB que remedarían los subtipos transcriptómicos. Por tanto, esta estrategia podría tener una aplicación en la práctica clínica diaria.

#### I.4. GB en la población pediátrica

Los GB constituyen una neoplasia mucho menos frecuente, en términos absolutos, en la población infantil (Ostrom 2014), pero la supervivencia a 2 años del GB en edad pediátrica es de aproximadamente el 12%, lo que lo convierte en una de las principales causas de muerte relacionadas con neoplasia en este grupo de edad (Broniscer 2004).

Un gran número de estudios indican que el mecanismo molecular que subyace al origen del GB es diferente en la población pediátrica que en la población adulta (Paugh 2010, Jones 2016). Así, las principales alteraciones moleculares en los GB de pacientes por debajo de los 19 años son la *PDGFRA* y las mutaciones en *H3F3A*, alteraciones más infrecuentes en adultos (Sturm 2012). Los GB en población pediátrica pueden mostrar *ATRXm* y *TP53m*, pero no suelen presentar *IDHm* (Paugh 2010). Estas son algunas de las diferencias a nivel molecular, pero existen muchas otras. Estas diferencias son también evidentes entre los gliomas de menor grado, por lo que, a día de hoy, los gliomas pediátricos y los gliomas en adultos se consideran dos enfermedades biológicamente distintas que deben ser estudiadas de manera individualizada.

Por todo ello, en el presente trabajo se han incluido únicamente casos de pacientes adultos con GB (mayores de 18 años de edad)

## ***II. Hipótesis y objetivos***



## **II.1. Hipótesis del trabajo**

En base a los datos publicados en la literatura, la segregación del glioblastoma (GB) en subtipos moleculares basados en perfiles de expresión génica (PEG) podría tener una utilidad clínica, estableciendo grupos de tumores con diferente supervivencia y diferente respuesta a la terapia.

**Creemos que esta clasificación de los GB por PEG podría reproducirse, de una manera más simple y económica, mediante el empleo combinado de algunas de las técnicas empleadas habitualmente en los departamentos de anatomía patológica.**

## **II.2. Objetivos del trabajo**

### ***II.2.1. Objetivo principal***

Nuestro objetivo principal es analizar una serie de 14 marcadores moleculares (mediante IHQ, FISH o PCR) para elaborar un modelo que nos permita clasificar nuestra serie de GB en subgrupos que remeden los subtipos transcriptómicos de GB descritos, y evaluar si esta clasificación puede tener una utilidad clínica en términos de diferencias en la supervivencia.

### ***II.2.2. Objetivos secundarios***

Como objetivos secundarios pretendemos:

1. Conocer la frecuencia de estas alteraciones moleculares en nuestra serie de casos y compararlas con la literatura
2. Estudiar cómo se relacionan entre sí estas alteraciones moleculares
3. Analizar si existe relación entre cada una de las alteraciones moleculares y la supervivencia de los pacientes
4. Describir las características morfológicas de los casos de nuestra serie y evaluar si existe relación entre las características morfológicas y las alteraciones moleculares
5. Describir las características clínicas, morfológicas y moleculares de los diferentes subgrupos de GB obtenidos



### ***III. Materiales y métodos***



### **III.1. Selección de los casos del estudio**

Nuestro estudio incluye el análisis retrospectivo de 64 casos de GB correspondientes a 64 pacientes adultos tratados en el Hospital Germans Trias i Pujol (HUGTIP, Badalona, Barcelona) entre los años 1997 y 2006. El tejido tumoral analizado corresponde al material obtenido durante la intervención quirúrgica en el momento del diagnóstico. De los casos operados en ese periodo de tiempo, se eligieron aquellos en los que la cantidad de tumor extraído fuera suficiente para poder realizar los análisis pertinentes.

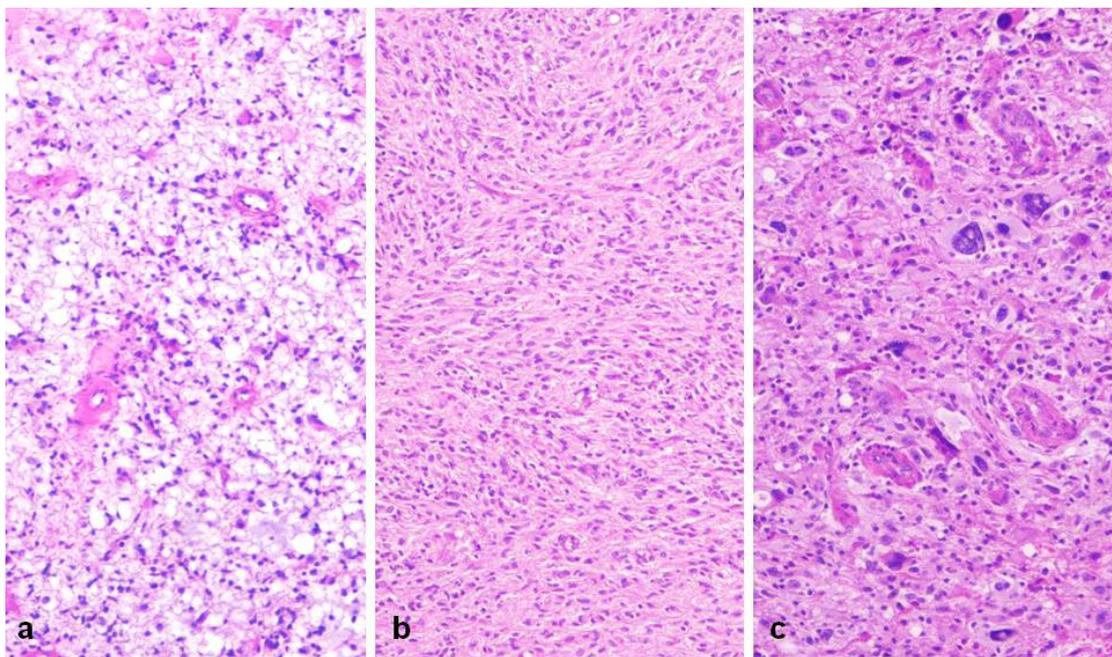
En ninguno de los pacientes había evidencia histológica ni radiológica de un tumor cerebral previo, es decir, el estudio no incluye ningún caso de los denominados sGB. El resto de características clínicas (edad, sexo, tipo de cirugía, KPS, tratamiento QT/RT recibido y SG) y las características radiológicas (lateralidad, localización y multifocalidad) de los pacientes se describen en el apartado de resultados.

El Comité Ético de Investigaciones Clínicas (CEIC) del HUGTIP aprobó el protocolo del estudio. Los pacientes dieron su consentimiento para la utilización del tejido tumoral sobrante tras el diagnóstico de su enfermedad. Se anonimizaron los datos de filiación y se asignó un código específico para cada paciente al que se vincularon los diferentes datos moleculares obtenidos en el estudio.

### **III.2. Características histopatológicas de los tumores**

Dos patólogos del HUGTIP revisaron los casos incluidos en el estudio y confirmaron en todos ellos el diagnóstico histológico de GB según los criterios establecidos por la OMS en 2007 (Louis 2007). Se asignó la variante o patrón de GB (definidos por la OMS y descritas en el apartado de introducción) a los casos en donde procediera. A partir de este punto los denominaremos a todos ellos “variantes” de GB, por simplificar y no confundir con los patrones histológicos que describiremos más abajo. Los tumores catalogados como GB con metaplasia epitelial (GBME) fueron reevaluados con posterioridad para descartar la inclusión en este grupo de casos de GB epitelioides (GBE), una nueva entidad en la clasificación de la OMS de 2016 (Louis 2016). Para la definición de un GB como GBCP se utilizó el criterio propuesto por Perry y col, que exigen más del 80% de componente de células pequeñas (Perry 2004).

En todos los casos se valoró, además, el patrón histológico predominante del tumor y la presencia de diversas variables morfológicas, como sigue. Se definieron tres patrones histológicos (PH) de GB basados en las descripciones de Motomura y col (Motomura 2012): un primer patrón o PH-A (el más frecuente entre los casos de GB tipo PRN de Motomura), caracterizado por células tumorales de núcleos redondeados u ovalados, con procesos citoplasmáticos finos y delicados, acompañadas o no de células más pleomórficas o multinucleadas; un segundo patrón o PH-B (el asociado a los casos de GB MES), de aspecto más homogéneo, con células fusiformes o gemistocíticas, con procesos citoplasmáticos más gruesos y de límites bien definidos; y un tercer patrón o PH-C (el más prevalente entre los casos de GB CLS), de aspecto similar al descrito anteriormente pero más heterogéneo, con elementos celulares bizarros, CGM y células de tamaño pequeño y núcleo irregular e hiper cromático. Se definió un cuarto patrón histológico (PH-D) para los casos de GB CP, porque en las descripciones de Motomura y col no quedaba claro en cuál de los PH se englobarían estos casos (Figura 18).



**Figura 18:** Imagen microscópica de los diferentes patrones histológicos de GB descritos en este trabajo. **(a)** Patrón histológico A. **(b)** Patrón histológico B. **(c)** Patrón histológico C. (El PH-D se correspondería con el aspecto típico de un GB CP, del que ya se ha mostrado una imagen en el apartado de introducción)

En lo referente a las variables morfológicas, se valoró la presencia de necrosis isquémica, necrosis con empalizada nuclear, proliferación microvascular (PMV) y células gigantes multinucleadas (CGM), así como la existencia de un componente de células pequeñas. En la Tabla 3 se describen los criterios utilizados para la valoración de cada una de estas variables.

Variable morfológica	Definición y sistema de valoración
<b>Necrosis isquémica</b>	Necrosis sin empalizada <i>Presente/Ausente</i>
<b>Necrosis en empalizada</b>	Necrosis con empalizada nuclear <i>Presente/Ausente</i>
<b>Proliferación microvascular</b>	Proliferación en número y tamaño de las células endoteliales y perivasculares <i>Presente/Ausente</i>
<b>Células gigantes multinucleadas</b>	Células con más de un núcleo o con núcleos hiperlobados <i>Presentes (evidentes con el objetivo de 4x)/Ausentes</i>
<b>Células pequeñas</b>	Células con escaso citoplasma y con mínima atipia nuclear <i>Presentes (evidentes con el objetivo de 4x)/Ausentes</i>

**Tabla 3:** Definición de las variables morfológicas analizadas y sistema de valoración empleado para cada una de ellas

### III.3. Estudio IHQ y de FISH sobre matrices de tejido

#### III.3.1. Preparación de las matrices de tejido

De manera análoga a la descrita con anterioridad (Balaña 2011) se construyeron dos matrices de tejido (TMA) con el material fijado en formol (tamponado al 10%) e incluido en parafina de las 64 muestras tumorales. Se revisaron las laminillas teñidas con hematoxilina-eosina y se seleccionaron las zonas de tejido tumoral viable del centro de la lesión, para minimizar la contaminación de la muestra por tejido cerebral sano. Utilizando una estación manual para la generación de TMA (MTA-1, Beecher Instruments, Silver Spring, Maryland, EEUU) se obtuvieron tres cilindros de 0,6mm de diámetro de los bloques correspondientes a cada caso, que se dispusieron en dos bloques de parafina vacíos o receptores. Los dos TMA contenían, además de los casos problema, 12 cilindros de tejido control neoplásico y no neoplásico. Entre ellos había una muestra de córtex cerebral sin alteraciones histológicas y un caso de AIII.

Para valorar la representatividad de los diferentes casos, se obtuvo una primera sección de cada uno de los bloques de TMA, que se tiñó con hematoxilina-eosina. Los estudios de IHQ y de FISH se realizaron sobre secciones obtenidas de los TMA y para cada marcador se evaluaron únicamente los casos donde se conservaba al menos el 50% del área de uno de los tres cilindros obtenidos.

### III.3.2. Estudio inmunohistoquímico

Se realizó tinción IHQ para la detección de IDH1-R132H, p53, PTEN, CD44, Olig2, p16, D2-40, PDGFRA, vimentina (VIM), proteína glial fibrilar ácida (PGFA), sinaptofisina (SINA) y Ki67 sobre secciones obtenidas de los TMA. En un segundo tiempo se analizó la expresión IHQ de ATRX (ver más adelante).

Para cada una de las determinaciones, se obtuvieron secciones de 4  $\mu$  de los dos TMA, que se dispusieron sobre portaobjetos con carga electrostática y se hornearon durante 30 min a 60°C para una adecuada adhesión del tejido al portaobjetos. A partir de este punto se utilizaron dos sistemas automatizados de inmunotinción diferentes: el sistema Benchmark XT (Ventana Medical System Inc., Tucson, Arizona, EEUU) para el estudio de IDH1-R132H, p53, CD44, Olig2, p16, VIM, PGFA, Ki67 y ATRX, y el sistema En Vision™ (Dako En Vision™+System HRP, Amarillo, Texas, EEUU) para PTEN, D2-40, PDGFRA y SINA. Ambos sistemas consisten en un proceso automatizado propio donde cada paso utiliza una solución específica e incuba a un tiempo y a una temperatura determinada. El proceso empieza con la desparafinización de la muestra y la recuperación antigénica. Para ello el sistema de Ventana aplica una solución que se denomina CC1 a un pH 8,4. Por el contrario, el sistema de Dako aplica la solución *target retrieval* a pH 8,4 o a pH 6 (únicamente se utilizó pH 6 en el caso de SINA). El siguiente paso es el bloqueo de la actividad peroxidasa endógena. Posteriormente la muestra se incuba con los diferentes anticuerpos primarios durante 30 min (a 37°C en el caso de Benchmark XT y a temperatura ambiente para En Vision™) y 30 min más con un polímero conjugado con peroxidasa que actúa a modo de anticuerpo secundario. El procedimiento automatizado se completa con el revelado de la reacción, utilizando como cromógeno tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina (DAB). Las muestras se contratiñen con hematoxilina fuera ya del procesador en el caso de Benchmark XT (3 seg en hematoxilina de Harris) y todavía dentro en el caso de En Vision™. Para acabar se deshidrata el tejido con etanol a concentraciones crecientes y se montan las preparaciones con cubreobjetos.

En la Tabla 4 se detallan los anticuerpos primarios utilizados y las diluciones empleadas.

Antígeno	Clon	Fuente	Dilución
<b>IDH1-R132H</b>	H-09	Dianova, Hamburgo, Alemania	1/40
<b>p53</b>	DO-7	Novocastra, Newcastle, Inglaterra	1/500
<b>PTEN</b>	6H2.1	Dako, Agilent Technologies, Glostrup, Dinamarca	1/100
<b>CD44</b>	SP37	Ventana, Tucson, Arizona, EEUU	(Prediluido)
<b>Olig2</b>	EP-112	Abcam, Cambridge, Reino Unido	1/100
<b>p16</b>	E6H4	Ventana, Tucson, Arizona, EEUU	(Prediluido)
<b>D2-40</b>	D2-40 <sup>1</sup>	Dako, Agilent Technologies Glostrup, Dinamarca	(Prediluido)
<b>PDGFRA</b>	sc-338	Santa Cruz, Dallas, Texas, EEUU	1/300
<b>VIM</b>	V9	Dako, Agilent Technologies, Glostrup, Dinamarca	1/300
<b>PGFA</b>	6F2	Dako, Agilent Technologies, Glostrup, Dinamarca	1/10000
<b>SINA</b>	Snp88	Biogenex, San Ramón, California, EEUU	1/800
<b>Ki67</b>	MIB-1	Dako, Agilent Technologies, Glostrup, Dinamarca	1/600
<b>ATRX</b>	PA001906	Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EEUU	1/300

**Tabla 4:** Proteínas analizadas y características de los anticuerpos primarios utilizados

Todos los resultados fueron evaluados por dos patólogos. Los casos en los que hubo discordancia se revisaron de manera conjunta y se consensuó una única puntuación.

Se evaluó la expresión proteica en la población celular tumoral y se obvió cualquier tipo de positividad cuyo patrón morfológico pudiera corresponder a otro tipo celular, como células endoteliales, microglía, o células inflamatorias. La interpretación de los patrones de tinción y de los puntos de corte para los diferentes anticuerpos se basó en los trabajos publicados en la literatura (esta información se detalla más abajo). Esta interpretación fue siempre una estimación visual de la proporción de células positivas o de la intensidad de la tinción y no se utilizaron sistemas de digitalización de imagen para análisis automatizados.

Para IDH1-R132H se consideró como positivo cualquier caso que mostrase tinción citoplasmática con o sin tinción nuclear (Capper 2009).

Para la valoración de la inmunotinción de p53 se cuantificó la proporción de células neoplásicas con positividad nuclear intensa, como sigue: 0: menos del 5% de células positivas; 1: entre el 5 y el 10% de células positivas; 2: entre el 10 y el 25% de células positivas; 3: entre el 25 y el 50% de células positivas; y 4: más del 50% de células positivas. Se definió como caso positivo para p53 aquel con tinción nuclear en más del 10% de las células tumorales (Takami 2015).

En el caso de PTEN, se valoró la intensidad de la tinción citoplasmática de las células neoplásicas en comparación con la intensidad de la tinción en los endotelios de la misma muestra. Se consideró como caso positivo para PTEN aquel en que la tinción tumoral era de igual intensidad que la observada en los endotelios (Wiencke 2007).

Para CD44, Olig2, p16, D2-40, VIM y PGFA se evaluó el porcentaje de células tumorales positivas en una escala de 0 a 5, como sigue: 0: ninguna célula positiva; 1: positividad en el 5% o menos de las células tumorales; 2: positividad entre el 5 y el 25%; 3: positividad entre el 25 y el 50%; 4: positividad entre el 50 y el 75%; y 5: positividad en más del 75% de las células tumorales. Los casos definidos como positivos debían presentar tinción citoplasmática en el caso de CD44, D2-40, VIM y PGFA, y tinción nuclear para Olig2 en más del 50% de la población tumoral (Motomura 2012). Para p16 la tinción debía ser nuclear y citoplasmática en más del 5% de células tumorales (Purkait 2013).

Para PDGFRA, y como la totalidad de los casos mostraban inmunopositividad citoplasmática difusa en las células tumorales, se eligió una escala basada en la intensidad de tinción como sigue: 1: leve; 2: moderada; 3: marcada. Se consideraron como casos positivos para PDGFRA aquellos con una intensidad de tinción moderada o marcada.

Se analizó la expresión de SINA y si existía algún tipo de positividad citoplasmática el caso se catalogó como positivo.

Para determinar el índice de positividad para Ki67 se contaron 100 células tumorales por cilindro (hasta 300 células por caso). El resultado se expresó como el porcentaje de positividad para cada tumor.

En cuanto a la inmunotinción para ATRX, se clasificaron como casos negativos (con pérdida de la expresión de ATRX) aquellos en los que menos de un 10% de la población tumoral mostraba tinción nuclear para ATRX (Wiestler 2013). Tal y como describe la literatura, se consideraron como no valorables todos aquellos casos negativos en los que no se observó tinción nuclear en los endotelios de la misma muestra (a modo de control interno positivo) (Tanboon 2016).

En la Tabla 5 se muestra un resumen de los diferentes puntos de corte para cada uno de los marcadores IHQ empleados.

Antígeno	Definición de positividad
<b>IDH1-R132H</b>	Positividad citoplasmática en las células tumorales
<b>p53</b>	Más del 10% de cel. tumorales con positividad nuclear intensa
<b>PTEN</b>	Igual intensidad de positividad en las cel. tumorales que en las cel. endoteliales
<b>CD44</b>	Más del 50% de cel. tumorales con positividad citoplasmática
<b>Olig2</b>	Más del 50% de cel. tumorales con positividad nuclear
<b>p16</b>	Más del 5% de cel. tumorales con positividad citoplasmática y nuclear
<b>D2-40</b>	Más del 50% de cel. tumorales con positividad citoplasmática
<b>PDGFRA</b>	Positividad citoplasmática de intensidad moderada o marcada en las células tumorales
<b>VIM</b>	Más del 50% de cel. tumorales con positividad citoplasmática
<b>PGFA</b>	Más del 50% de cel. tumorales con positividad citoplasmática
<b>SINA</b>	Positividad citoplasmática en las células tumorales
<b>Ki67</b>	Porcentaje de cel. tumorales con tinción nuclear
<b>ATRX</b>	Más del 10% de cel. tumorales con positividad nuclear

**Tabla 5:** Definición de positividad para cada uno de los marcadores IHQ analizados

En los casos donde la puntuación obtenida con cualquiera de los marcadores fue diferente en los 3 cilindros del caso, se eligió siempre el valor más prevalente; y en el caso de 3 puntuaciones diferentes se eligió el valor intermedio. En los casos con sólo dos puntuaciones, cuando éstas eran diferentes se revisaron de nuevo los cilindros y se asignó una puntuación única final. Para PTEN, los 2 casos con sólo dos cilindros valorables y diferente puntuación se consideraron como casos negativos, pues el evento a detectar era la pérdida de la expresión proteica.

Como hemos mencionado anteriormente, los TMA contenían tejidos control que se utilizaron, según el anticuerpo empleado y el tipo de tejido, como controles positivos o negativos. Se analizó con especial atención la expresión de cada uno de los marcadores IHQ en el caso correspondiente a córtex cerebral no tumoral y en el AIII.

### **III.3.3. Estudio mediante FISH**

Se estudió la amplificación de *EGFR* y *PDGFRA* (*EGFRa* y *PDGFRAa*) mediante FISH sobre secciones de los TMA. Para el estudio de *EGFR* se utilizó la sonda Vysis EGFR/CEP7 FISH probe kit (Abbott Molecular Inc, Des Plaines, IL, EEUU). Para el estudio de *PDGFRAa* se diseñó una sonda usando los clones RP11-626H04 y RP11-117E08 de la genoteca humana 32K BAC (CHORI BACPAC Resources Center Oakland, CA, EEUU). El ADN de los clones se aisló mediante el Qiagen Kit Midi plasmid (Qiagen, Valencia, CA, EEUU) y se marcó con Spectrum Green (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, EEUU).

Para ambos casos, se obtuvieron secciones de 4  $\mu$  de los TMA que fueron desparafinadas en xilol, rehidratadas con etanol a concentraciones decrecientes y procesadas con el Histology FISH Accessory Kit (Dako, Glostrup, Dinamarca). El pretratamiento y la digestión enzimática de las muestras se realizaron según las instrucciones del fabricante. Brevemente, las muestras rehidratadas se incubaron 10 min a 96°C en tampón de pretratamiento, se lavaron 2x3 min en tampón de lavado y se digirieron con pepsina 6 min a 37°C. Se paró la digestión con tampón de lavado (2x3 min). Las muestras se deshidrataron en series crecientes de etanol y se dejaron secar al aire. Tras aplicar la sonda, las laminillas fueron codesnaturalizadas 4 min a 85°C e hibridadas toda la noche a 37°C en hibridador (ThermoBrite, Abbott Molecular Inc, Des Plaines, IL, EEUU). Posteriormente se realizó el lavado de astringencia en 2xSSC/0,3% Tween-20, 2 min a 72°C. Las muestras fueron deshidratadas de nuevo, se secaron al aire y se montaron en medio de montaje fluorescente con 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) como contratinción nuclear. Utilizando un microscopio de fluorescencia Olympus BX51, se valoraron entre 50 y 100 núcleos no superpuestos en cada uno de los cilindros del TMA.

Las muestras se consideraron amplificadas para *EGFR* cuando >10% de las células tumorales presentaron una relación EGFR/CEP7 >2 o bien innumerables señales de la sonda EGFR en alguno de los cilindros del caso (Korshunov 2004).

En el caso de *PDGFRA*, al no disponer de sonda centromérica, las muestras se consideraron amplificadas cuando >40% de las células tumorales presentaron 6-12 copias del gen o cuando alguna célula neoplásica tenía  $\geq 12$  copias del gen en alguno de los cilindros del caso (Phillips 2013).

#### III.4. Detección de la variante III de *EGFR*

La forma delecionada *EGFRvIII* se determinó a partir del ARN total extraído con el kit Absolutely RNA® FFPE (Stratagene, San Diego, California, EEUU) de las secciones obtenidas de uno de los bloques de parafina del caso con más del 10% de celularidad tumoral. La concentración de ARN se obtuvo midiendo la absorbancia de la muestra a 260 nm en un espectrofotómetro DS-11 (DeNovix, Wilmington, Delaware, EEUU). Se realizó la retrotranscripción a partir de 2  $\mu\text{g}$  de ARN utilizando el kit "Ready-to-go you prime first-strand beads" (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido). Se llevaron a cabo dos amplificaciones de PCR utilizando como molde el ADN complementario (ADNc). En la primera se utilizan cebadores que se unen a los exones 1 y 2, y con ello se amplifica una banda correspondiente al alelo no mutado. Dicha amplificación sirve de control de la calidad de la muestra y de la retrotranscripción. Con la segunda amplificación se detecta el alelo *EGFRvIII* y para ello se utilizan cebadores que se unen a los exones 1 y 9 (Tabla 6). En cada amplificación se incluyó la muestra por duplicado, un control positivo de mutación y un control negativo sin muestra. Las condiciones de la PCR fueron: 5 min a 95°C, 38 ciclos de 20 seg a 95 °C- 30 seg a 55 °C- 30 seg a 72°C, y 5 min a 72°C. Las concentraciones finales de los reactivos fueron las siguientes: Ecotaq (Ecogen, Barcelona) a 0.02 U/ $\mu\text{l}$ ,  $\text{MgCl}_2$  (Ecogen, Barcelona) a 2 mM, dNTP (Epicentre, Madison, Wisconsin, EEUU) a 250  $\mu\text{M}$  y cebadores a 0,4 $\mu\text{M}$ . El producto de las PCR se resolvió por electroforesis en geles de agarosa (al 2%) y se consideraron mutados los casos donde se obtuvo banda en ambas PCR, la del alelo mutado y la del no mutado.

#### III.5. Estudio del estado de metilación del promotor del gen *MGMT*

Para el análisis del estado de metilación del *pMGMT*, se obtuvo ADN a partir de las secciones de uno de los bloques de parafina del caso (con más del 10% de células tumorales) utilizando el kit Nucleospin II Tissue Kit (Machery Nagel, Düren, Alemania). La concentración de ADN se calculó midiendo la absorbancia de la muestra a 260 nm en el espectrofotómetro DS-11 (DeNovix, Wilmington, Delaware, EEUU). Para cada muestra, se modificaron entre 200 y 400 ng de ADN con bisulfito utilizando el kit EZ-DNA Methylation–Gold kit® (Zymo Research, Irvine, California, EEUU). A partir de este ADN modificado se realizó la PCR

específica de metilación (MSP), es decir, se amplificaron separadamente con cebadores específicos las secuencias de *pMGMT* metiladas y las no metiladas. En la Tabla 6 se describen los cebadores empleados para cada caso. En cada análisis se incluyó la muestra por duplicado, dos controles positivos (una muestra de ADN totalmente metilado y una de ADN totalmente no metilado) y un control negativo sin muestra. Las condiciones de la PCR fueron: 5 min a 95°C, 42 ciclos de 30 seg a 95 °C- 30 seg a 59 °C- 30 seg a 72°C, y 5 min a 72°C. Las concentraciones finales de los reactivos fueron las siguientes: HotStar Taq® Plus (Qiagen, Hilden, Alemania) a 0.02 U/μl, MgCl<sub>2</sub> (Ecogen, Barcelona) a 2 mM, dNTP (Epicentre, Madison, Wisconsin, EEUU) a 200 μM y cebadores a 0,4μM. Los productos de las PCR se resolvieron por electroforesis en geles de acrilamida al 6%.

### III.6. Estudio de secuenciación de *IDH-1* y *IDH-2*

En los casos de pacientes con edad ≤ a 55 años y en aquellos con una supervivencia superior a 2 años se realizó el estudio de las mutaciones puntuales R132 de *IDH1* y R172 de *IDH2*.

A partir del ADN, extraído de la muestra de igual modo que para el estudio del *pMGMT*, se amplificaron separadamente por PCR el exón 4 de los genes *IDH1* e *IDH2*, donde se localiza la mutación puntual más frecuente. En la Tabla 6 se detallan los cebadores utilizados. Las condiciones de la PCR fueron: 5 min a 95°C, 38 ciclos de 20 seg a 95 °C- 30 seg a 55 °C- 30 seg a 72°C, y 5 min 72°C. Las concentraciones finales de los reactivos fueron las siguientes: Ecotaq (Ecogen, Barcelona) a 0.02 U/μl, MgCl<sub>2</sub> (Ecogen, Barcelona) a 4 mM, dNTP (Epicentre, Madison, Wisconsin, EEUU) a 200 μM y cebadores a 0,2 μM. Se valoró la PCR por electroforesis en geles de agarosa al 2% y se purificaron los productos amplificados con el kit Nucleospin Gel&PCR clean-up (Machenery Nagel, Düren, Alemania). Este producto purificado sirvió como molde para realizar la reacción de secuenciación mediante el kit BigDye® Terminator v3.1 Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, California, EEUU) siguiendo las concentraciones de reactivos y las condiciones de PCR recomendadas por el fabricante, con una temperatura de *annealing* de 58°C y utilizando el cebador IDH1-F. Los productos de las secuenciaciones se precipitaron con etanol y se analizaron en el equipo AbiPrism 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California, EEUU).

Determinación	Región amplificada	Secuencia de los cebadores	Amplímero
<b>EGFRvIII</b>	Exones 1-2	F 5'- GGG CTC TGG AGG AAA AGA AAG -3'	72pb
		R 5'- CTC CAT CTC ATA GCT GTC GG-3'	
	Exones 1-9	F 5'- GGG CTC TGG AGG AAA AGA AAG -3'	88pb
		R 5'- GAT CTT CAA AAG TGC CCA AC -3'	
<b>pMGMTmet</b>	Promotor no metilado	F 5'- TTT GTG TTT TGA TGT TTG TAG GTT TTT GT -3'	92pb
		R 5'- AAC TCC ACA CTC TTC CAA AAA CAA AAC A -3'	
	Promotor metilado	F 5'-GGG CTC TGG AGG AAA AGA AAG -3'	80pb
		R 5'- CTC CAT CTC ATA GCT GTC GG -3'	
<b>IDH1</b>	Exón 4	F 5'-ACC AAA TGG CAC CAT ACG A-3'	164pb
		R 5'-GCA AAA TCA CAT TAT TGC CAA C-3'	
<b>IDH2</b>	Exón 4	F 5'-GCT GCA GTG GGA CCA CTA TT-3'	293 pb
		R 5'- TGT GGC CTT GTA CTG CAG AG-3'	

**Tabla 6:** Secuencia de los cebadores empleados para el estudio de EGFRvIII, del estado de metilación del promotor de MGMT (pMGMTmet) y de las mutaciones en los genes IDH1 e IDH2. (F: foward, R: reverse, pb: pares de bases)

### III.7. Análisis estadísticos

#### III.7.1. Consensus clustering

De manera similar a la metodología empleada por Motomura y col (Motomura 2012), aplicamos un procedimiento de *consensus clustering* a nuestros datos moleculares (IHQ y no IHQ) para identificar diferentes subgrupos de GB. El *clustering* permite agrupar elementos en clases o grupos (*clusters*), de manera que los elementos (en nuestro caso GB) que pertenecen a un mismo grupo son más similares entre sí que a los casos de otros grupos. Esta similitud se refleja habitualmente en términos de una medida de distancia. El *consensus clustering* es una herramienta de agrupamiento (o *clustering*) que permite estimar la estabilidad estadística de los grupos identificados (Abu-Jamous 2013). De entre los diferentes procedimientos para realizar un agrupamiento de estas características, uno de los más frecuentemente utilizados (y el empleado en el estudio de Motomura y col) es el *k-means clustering*, que usa como medida la denominada distancia euclídea. Se evaluaron todas las posibilidades entre 2 y 5 grupos y para ello se analizaron los valores obtenidos para cada variable molecular en más de 10.000 interacciones con el 80% de reanálisis de un mismo elemento. Se escogió el número de grupos que mostró una mejor estabilidad de agrupamiento con un menor número de asignaciones ambiguas en las diferentes

ejecuciones del *clustering* (la descripción del modelo de *consensus clustering* empleada en este trabajo se ampliará en el apartado de resultados).

### **III.7.2. Resto de análisis estadísticos**

El resto de análisis estadísticos fueron llevados a cabo utilizando el programa Statistical Package for Social Science (SPSS 18.0, IBM, Nueva York, EEUU). Una diferencia se consideró estadísticamente significativa cuando el “valor p” era igual o inferior a 0,05.

La edad y la actividad proliferativa (Ki67) se consideraron como variables cuantitativas y el resto de variables, incluyendo la puntuación obtenida para las diferentes determinaciones moleculares (IHQ y no IHQ), como cualitativas. Las variables edad y KPS se agruparon en rangos con valor pronóstico (edad  $\geq$  o  $<$ 50 años, KPS  $\geq$  o  $<$ 70).

Se evaluaron las variables morfológicas y moleculares de manera descriptiva y se estudiaron las relaciones estadísticas de independencia entre las diferentes variables cualitativas mediante el test de Chi cuadrado o el test exacto de Fisher cuando fue necesario. Para el estudio de la comparación de medias de las variables cuantitativas se utilizaron los test no paramétricos de U de Mann-Whitney (para dos grupos) y de Kruskal-Wallis (para más de dos grupos).

Se definió como supervivencia global (SG) el intervalo de tiempo transcurrido entre la fecha de la intervención quirúrgica y la fecha de la muerte o el último control del paciente. Los enfermos en los que se perdió el seguimiento se consideraron pacientes censurados. El resto había fallecido en el momento del análisis de los datos de este estudio. La SG se evaluó mediante el método de Kaplan-Meier y para comparar la diferencia entre las curvas de supervivencia se utilizó el test log-rank. Los análisis multivariantes se hicieron con el modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox-Mantel.

## ***IV. Resultados***



#### IV.1. Características clínicas y radiológicas de los pacientes

La edad mediana de nuestros pacientes en el momento del diagnóstico fue de 64 años (rango de edad entre 20 y 77 años) y en el 84,4% de los casos la edad coincidía con el pico esperado en los GB (entre 55 y 85 años) (Louis 2016). La relación hombres/mujeres fue de 1,06. Todos los tumores eran supratentoriales y superficiales (área cortical/subcortical). En 9 de los 64 casos (14%) la lesión era multifocal (definida radiológicamente como dos o más focos con captación de contraste separados por una distancia mínima de 1cm) (Patil 2012). Veintisiete de los casos ocupaban el lado izquierdo y 37 el derecho. En cuanto a la distribución por lóbulos, 23 casos asentaban en el lóbulo frontal y 19 en el temporal, como localizaciones más frecuentes.

En 8 de los casos (12,5%) la cirugía consistió en biopsia de la lesión tumoral y el resto fueron resecciones: parcial en 40 casos (62,5%) y completa (definida como ausencia de enfermedad residual en la RMN) en los 16 restantes (25%). El KPS postquirúrgico oscilaba entre el 50 y 100%. Tras la cirugía, 63 de los 64 pacientes recibieron tratamiento con QT basada en carmustina (BCNU) (en 26 casos) o en temozolomida (TMZ) (en 36 casos). Un único paciente recibió tratamiento intracavitario con obleas de BCNU (Gliadel®). Sesenta pacientes recibieron RT (incluyendo el único paciente que no recibió QT), 58 con dosis de 60Gy y los dos restantes con dosis <40Gy. En 8 de los casos el esquema de tratamiento fue el descrito por Stupp (RT con TMZ concomitante y adyuvante) (Stupp 2005). Cuarenta y tres de los pacientes (67,2%) recibieron tratamiento a la progresión.

La mediana de SG fue de 13 meses, con un rango de 1 a 90 meses. Ocho de los enfermos estaban vivos a los 2 años (12,5%) y 2 a los 5 años (3%). La mediana de SLP fue de 6,8 meses.

En la Tabla 7 se resume la información clínica más relevante.

Variable clínica	Valores
Mediana de edad (rango)	64a (20a-77a)
KPS (rango)	50%-100%
Tipo de cirugía (Bx/RP/RC)	8/40/16
RT+QT/QT/RT	59/4/1
Mediana de SG en meses (rango)	13m (1-90m)

**Tabla 7:** Resumen de las características clínicas más relevantes. Para las variables tipo de cirugía y tratamiento los valores indican el número de pacientes en cada categoría. (Bx: biopsia; RP: resección parcial; RC: resección completa)

## IV.2. Características histopatológicas de los tumores

En los 64 casos se confirmó el diagnóstico de GB: 3 de ellos fueron clasificados como gliosarcomas (GS), 3 como GB de células pequeñas (GBCP), 2 como GB con componente oligodendroglial (GBCO) y 2 como GB con metaplasia escamosa (GBME). Diecisiete casos (26,6%) mostraron un patrón histológico tipo A (PH-A) (definido como se explica en materiales y métodos), 29 (45,3%) un PH-B, 15 (23,4%) un PH-C y 3 (4,6%) un PH-D.

Con respecto a las variables morfológicas analizadas, el 90,6% de los casos mostró necrosis isquémica y el 67,2% necrosis con empalizada. En el 95,3% se observó proliferación microvascular (PMV). En cuanto al componente celular, el 39,1% tenían células gigantes multinucleadas (CGM) y el 40,6% un componente de célula pequeña. Estos resultados se recogen en la Tabla 8.

Variable morfológica	Frecuencia (n=64) (%)
Patrón histológico (A/B/C/D)	17(27) / 29(45) / 15(23) / 3(5)
Necrosis isquémica	58 (91)
Necrosis con empalizada	43 (67)
Proliferación microvascular	61 (95)
Células gigantes multinucleadas	25 (39)
Células pequeñas	26 (41)

**Tabla 8:** Frecuencias de las diferentes variables morfológicas analizadas. El resultado se expresa como número de casos positivos del total de 64 casos y como porcentaje

## IV.3. Frecuencia de las diferentes alteraciones moleculares

Las tinciones de IHQ y el estudio de FISH sobre TMA resultaron en la pérdida de algunos casos por problemas técnicos, por lo que el total de casos estudiados para cada uno de estos eventos moleculares fue variable y no siempre igual a 64. Los puntos de corte para las diferentes variables IHQ se han descrito en el apartado de materiales y métodos.

### **IV.3.1. Marcadores IHQ**

Además de en los casos de GB, se analizó la expresión IHQ de las diferentes proteínas en la muestra de córtex cerebral no patológico y en el AIII incluidos como tejidos control en los TMA.

De los 62 casos evaluables, ninguno de ellos mostró positividad para IDH1-R132H, al igual que también resultó negativo el tejido cerebral control. Por contra, el caso del AIII sí mostró inmunotinción para IDH1-R132H.

Treinta y uno de los 61 casos de GB fueron positivos para p53. En la escala de 0 a 4, tal y como se define en el apartado de materiales y métodos, los casos se distribuyeron de la siguiente manera: 0: 22 casos, 1: 8 casos, 2: 14 casos, 3: 7 casos y 4: 10 casos. No se observó positividad en los cilindros correspondiente al tejido cerebral no tumoral, y sí una tinción difusa e intensa en el caso del AIII.

Cuarenta y cuatro de los 61 casos mostraron positividad para PTEN. Dicho de otro modo, 17 casos tenían pérdida de la expresión de PTEN, lo que constituye realmente el evento molecular a detectar. El tejido cerebral normal fue negativo y el AIII mostró una tinción intensa y difusa.

En relación a CD44, 51 de los 61 casos evaluables presentaron sobreexpresión de CD44. En la escala de 0 a 5, los casos se distribuyeron de la siguiente manera: 0 y 1: ningún caso, 2: 6 casos, 3: 4 casos, 4: 17 casos y 5: 34 casos. No se observó positividad para CD44 ni en el fragmento de córtex cerebral ni en el caso del AIII.

Treinta y siete de los 61 casos valorados fueron positivos para Olig2. En la escala de 0 a 5, los casos se distribuyeron como sigue: 0: 8 casos, 1: 4 casos, 2: 7 casos, 3: 5 casos, 4: 22 caso y 5: 15 casos. El parénquima cerebral no tumoral mostró ocasionales células positivas (de aspecto oligodendroglial) y el caso de AIII resultó inmunopositivo.

La distribución de los casos según el porcentaje de células positivas para p16 fue un tanto curioso: en 20 de 61 casos no se observó inmunotinción, en 24 casos se evidenciaron ocasionales células positivas (menos del 5%), y el resto (los 17 casos positivos) revelaron más del 75% del componente tumoral positivo. Por tanto, y de igual modo que hemos expuesto para PTEN, fueron 44 los casos de GB con pérdida de la expresión de p16. El

## Resultados

parénquima cerebral sano fue negativo para p16 y en el caso del AIII se observaron en torno a un 25% de células inmunopositivas.

Cuarenta de 61 casos fueron positivos para D2-40. En la escala de 0 a 5, tal y como se define en el apartado de materiales y métodos, los casos se distribuyeron de la siguiente manera: 0: 4 casos, 1: 4 casos, 2: 6 casos, 3: 7 casos, 4: 7 casos y 5: 33 casos. No se observó inmunotinción para D2-40 ni en el cilindro de córtex cerebral ni en el caso de AIII.

El estudio IHQ de PDGFRA reveló 37 casos positivos de entre los 60 casos evaluables. En la escala de intensidad de 1 a 3 que definimos en el apartado de materiales y métodos, los casos se distribuyeron como sigue: 1: 23 casos, 2: 32 casos y 3: 5 casos. El parénquima cerebral control mostraba una tinción leve y el caso de AIII una tinción moderada.

Treinta y ocho de los 59 casos valorables para VIM y 43 de los 61 casos de GB en los que se pudo valorar PGFA resultaron positivos. En la escala de 0 a 5, los casos se distribuyeron de la siguiente manera: 0: ningún caso; 1: ningún caso para VIM y 1 caso para PGFA, 2: 6 y 3 casos, 3: 15 y 14 casos; 4: 28 y 20 casos, y 5: 10 y 23 casos, respectivamente. En el caso de la muestra de cerebro se observó inmunotinción para VIM únicamente en los capilares sanguíneos mientras que la tinción para PGFA fue difusa e intensa en el componente glial. El caso del AIII mostró positividad para VIM en aproximadamente el 25% de las células tumorales y para PGFA en más del 50%.

En cuanto a la valoración de la expresión de SINA, 19 de los 60 casos evaluables tenían algún tipo de positividad. En la gran mayoría de ellos el patrón de tinción, en forma de una fina granularidad de fondo en ocasiones de distribución parcheada, era sugestivo de corresponder a positividad no en el componente tumoral sino en tejido cerebral sano atrapado (Figura 19). Por ello (y por otros motivos, tal y como se detallará más tarde en el apartado de discusión) se decidió no considerar este resultado para el resto de los análisis. Como cabía esperar, el cerebro no neoplásico fue positivo para SINA, al igual que también observamos positividad (probablemente también artefactual) en el caso del AIII.

El porcentaje medio de células positivas para Ki67 fue del 17,6%, con un rango de entre el 5 y el 51%.

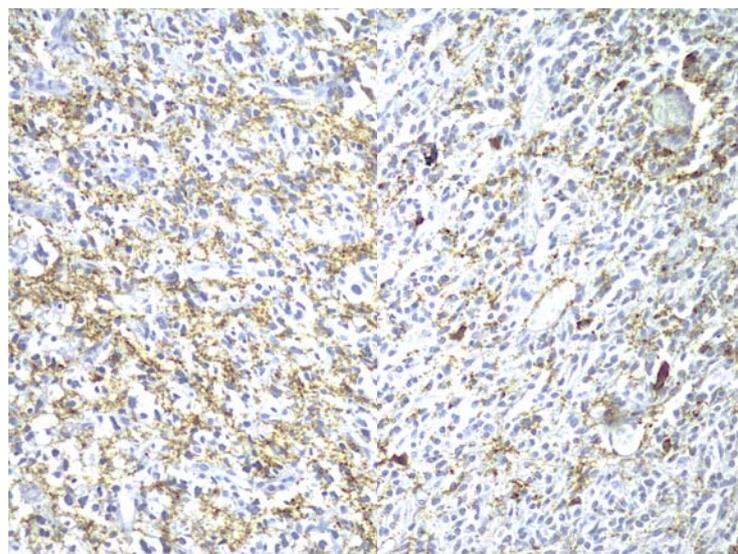
Sólo 3 de los 45 casos evaluables para ATRX mostraron pérdida de la expresión nuclear en más del 90% de las células tumorales. Esta información tampoco se ha incluido en el

resto de los análisis de los datos, puesto que se obtuvo en la fase final de nuestro estudio. Este punto se menciona también más adelante en el apartado de discusión.

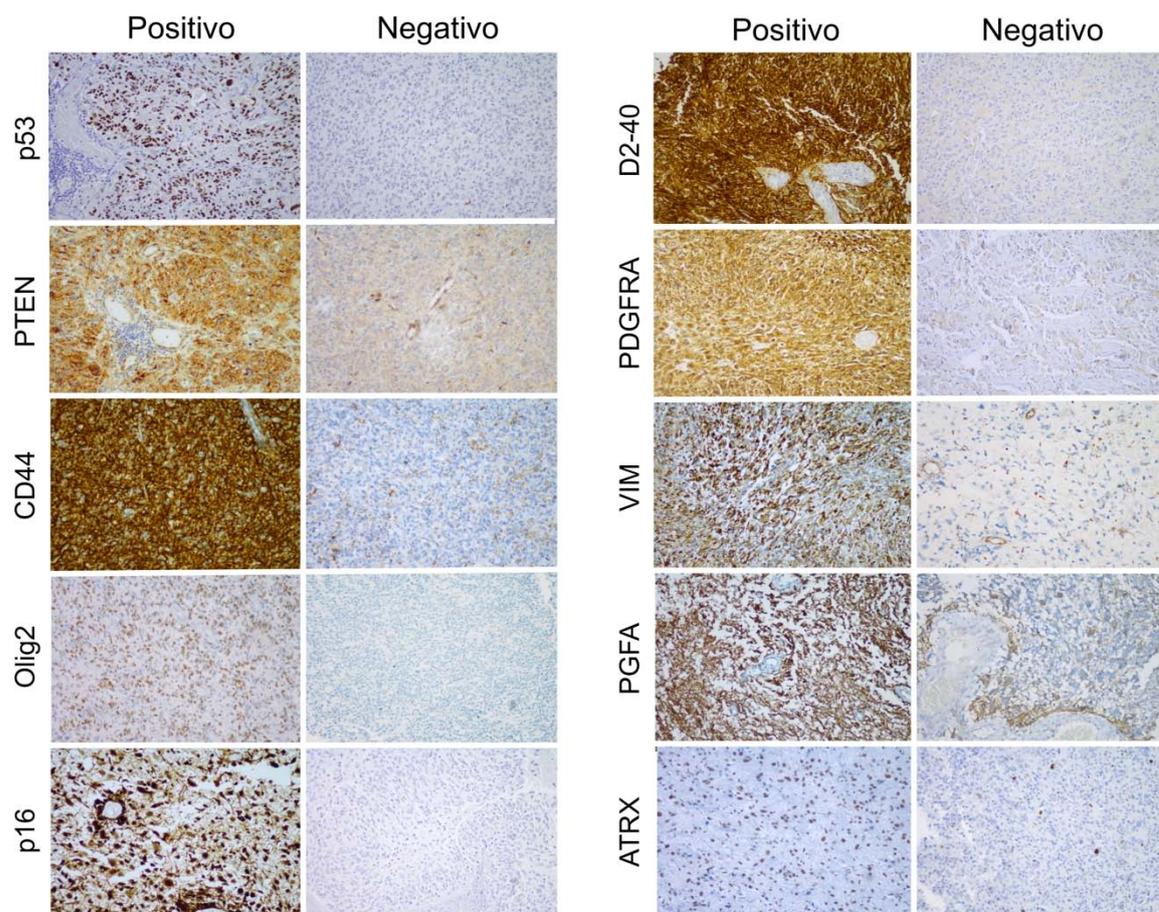
En la Tabla 9 se resumen los resultados obtenidos del estudio IHQ (a excepción de los resultados para Ki67) y en la Figura 20 se muestran imágenes representativas de casos positivos y negativos para los diferentes marcadores empleados.

Variable IHQ	Frecuencia (%)	Normal	AIII
IDH1-R132H	0/62 (0)	-	+
p53	31/61 (51)	-	+
PTEN	44/61 (72)	-	+
CD44	51/61 (84)	-	-
Olig2	37/61 (61)	+	+
p16	17/61 (28)	-	+
D2-40	40/61 (66)	-	-
PDGFRA	37/60 (62)	-	+
VIM	38/59 (64)	-	-*
PGFA	43/61 (70)	+	+
SINA	19/60 (32)	+	+
ATRX	42/45 (93)	nv	-

**Tabla 9:** Frecuencias de las diferentes variables IHQ estudiadas. Se detalla el resultado para cada marcador IHQ en los casos de GB (que se expresa como número de casos positivos/número total de casos evaluados y como porcentaje) y en el caso de cerebro no tumoral (Normal) y el AIII incluidos entre los controles de los TMA. En el caso del AIII, se observó un 25% de células tumorales inmunopositivas para VIM. Ya que el criterio de positividad para este marcador se ha definido como más del 50% de células positivas, el caso se muestra en la tabla como negativo (\*). (nv: no valorable)



**Figura 19:** Ejemplo de dos casos inmunopositivos para SINA con un patrón de distribución sugestivo de corresponder a tejido cerebral sano atrapado entre las células tumorales



**Figura 20:** Ejemplos de casos inmunopositivos e inmunonegativos para los diferentes marcadores IHQ empleados

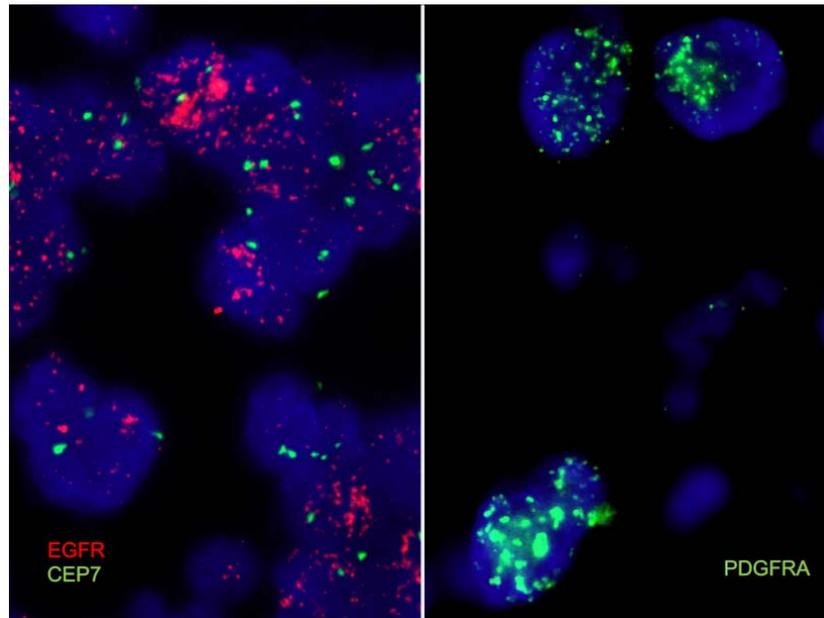
#### IV.3.2. Alteraciones de EGFR, PDGFRA, MGMT e IDH

Veintisiete de los 64 casos tenían *EGFRa* (42,2%) y 17 *EGFRvIII* (26,5%), 15 de ellos con *EGFRa* y dos no. El análisis de *PDGFRAa* mediante FISH reveló la existencia de 9 de 58 casos (15,5%) amplificados. Veinticuatro de los 64 casos estudiados (37,5%) mostraron *pMGMTmet*. De los 14 casos en los que se secuenció *IDH1* e *IDH2*, únicamente en uno de ellos se detectó una mutación en *IDH1*, del tipo p.R132C. Este caso, como cabe esperar, resultó negativo con la inmunotinción para *IDH1-R132H*.

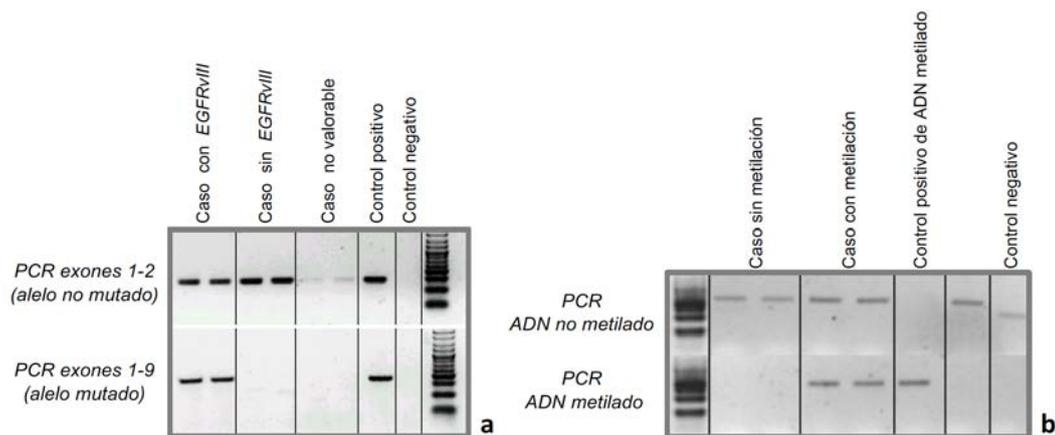
La Tabla 10 resume las frecuencias encontradas para cada uno de estos eventos moleculares y en las Figuras 21 y 22 se muestran algunos ejemplos.

Variable molecular	Frecuencia (%)
<i>EGFRa</i>	27/64 (42)
<i>EGFRvIII</i>	17/64 (27)
<i>PDGFRAa</i>	9/58 (16)
<i>pMGMTmet</i>	24/64 (38)
<i>IDHm</i>	1/14 (7)

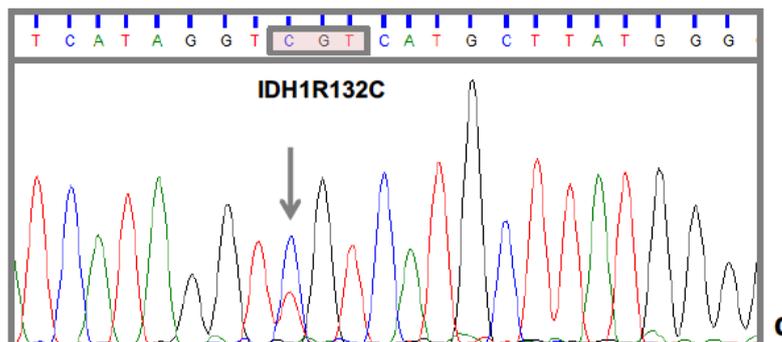
**Tabla 10:** Frecuencias de las diferentes variables moleculares no IHQ estudiadas. El resultado se expresa como número de casos positivos/número total de casos evaluados y como porcentaje



**Figura 21:** Ejemplo de casos con amplificación de *EGFR* y con amplificación de *PDGFRA*



**Figura 22:** Ejemplo de casos con y sin **(a)** *EGFRvIII*, **(b)** con y sin metilación del *pMGMT* y **(c)** el único caso con *IDH1m*. (PM: Peso molecular)



**Figura 22:** Ejemplo de casos con y sin (a) EGFRvIII, (b) con y sin metilación del pMGMT y (c) el único caso con IDH1m. (PM: Peso molecular)

#### IV.4. Relación entre las características histopatológicas y las variables moleculares

En este apartado se detallan, entre otras, las asociaciones observadas con los diferentes tipos de características histopatológicas. En lo referente a los patrones histológicos (PH) y a las variantes de GB, se detallan aquellas asociaciones que responden a algunas de las cuestiones planteadas por el trabajo, aunque en muchos de los casos no han alcanzado una significación estadística (ver más adelante en la discusión de los resultados). Para aquellas que sí la alcanzaron se ha añadido la información sobre el “valor p”. Para el estudio de la relación entre el resto de variables morfológicas y las variables moleculares se ha centrado el análisis en los resultados que sí mostraron una significación estadística (o al borde de la significación), ya que el volumen de los resultados obtenidos es muy elevado.

En todos los análisis de relación de variables que implican a las variables IHQ, éstas se han considerado como variables dicotómicas, positivas o negativas según los puntos de corte detallados en materiales y métodos.

##### IV.4.1. Relación entre las diferentes características histopatológicas

Se observó una relación esperable entre los diferentes PH y algunas de las variantes de GB, de tal modo que los 3 GS pertenecían al PH-B y los 3 GBPC al PH-D. Este hecho se explica claramente por la propia definición de los PH: el patrón predominantemente fusocelular es una de las definiciones de PH-B y el PH-D lo definimos de entrada como el correlato morfológico del GBPC. De los dos casos de GBCO, uno de ellos correspondía a un PH-A y uno a un PH-B, y de los dos casos de GBME, uno presentaba un PH-B y el otro un PH-C.

En cuanto a la asociación entre el PH y el resto de variables morfológicas, existía una mayor tendencia a la presencia de necrosis con empalizada y PMV en el PH-B (79,3% y 96,6%, respectivamente). Los casos de GB con PH-A eran los que mostraban menores niveles de necrosis isquémica. De nuevo, y por la propia definición de los PH, se observó una asociación entre el patrón y el componente de célula pequeña, que se encontraba sobrerrepresentado en el subtipo de PH-D (3/3 casos) y era menos frecuente entre el resto de los subtipos (23/61). De igual modo, la presencia de CGM fue más evidente en el grupo de GB PH-C (14/15) frente al resto (11/59) ( $p < 0,01$ ), también influenciada por la propia definición de los PH. Los tres casos con PH-D (GBCP) tenían necrosis con empalizada, PMV y, por definición, células pequeñas, con ausencia de CGM (Tabla 11).

	PH-A (n=17) (%)	PH-B (n=29) (%)	PH-C (n=15) (%)	PH-D (n=3)
<b>Necrosis isquémica</b>	15 (88)	27 (93)	14 (93)	2
<b>Necrosis con empalizada</b>	10 (59)	23 (79)	7 (47)	3
<b>Proliferación microvascular</b>	16 (94)	28 (97)	14 (93)	3
<b>Células gigantes multinucleadas</b>	6 (35)	5 (17)	14 (93)	0
<b>Células pequeñas</b>	7 (41)	11 (38)	5 (33)	3

**Tabla 11:** Relación entre patrones histológicos y resto de variables morfológicas. En naranja se señalan las asociaciones más destacadas. El resultado se expresa como número de casos positivos sobre el número total de casos evaluados para cada PH y como porcentaje. Los datos relacionados con el PH-D no se han considerado en los análisis de la relación entre patrones y variables moleculares. No obstante, constan en esta tabla a modo ilustrativo

#### IV.4.2. Relación entre las características histopatológicas y las variables moleculares

Los casos con PH-A mostraron los mayores niveles de expresión de Olig2 y PDGFRA ( $p=0,008$ ). Los GB PH-B tenían los niveles más bajos de p16 ( $p=0,016$ ) y PTEN y los mayores de D2-40 y PGFA. Los GB PH-C presentaron los niveles más altos de p53 ( $p=0,047$ ), CD44 y VIM. La media del índice de proliferación celular (Ki67) fue del 18%, 15% y 21% para los casos con PH-A, B y C, respectivamente. Puesto que el grupo de GB PH-D constituye un grupo muy minoritario (únicamente 3 casos) se ha considerado que la información obtenida en el mismo al respecto, no merece una mención especial, aunque se detalla en la Tabla 12.

	PH-A (%)	PH-B (%)	PH-C (%)	PH-D
<b>p53</b>	7/16 (44)	11/28 (39)	11/14 (79)	2/3
<b>PTEN</b>	12/16 (75)	19/28 (68)	12/14 (86)	1/3
<b>CD44</b>	14/16 (88)	24/28 (86)	13/14 (93)	0/3
<b>Olig2</b>	11/16 (69)	15/28 (54)	8/14 (57)	3/3
<b>p16</b>	5/16 (31)	4/28 (14)	8/14 (57)	0/3
<b>D2-40</b>	7/16 (44)	21/28 (75)	9/14 (64)	3/3
<b>PDGFRA</b>	14/16 (86)	11/27 (30)	9/14 (64)	3/3
<b>VIM</b>	7/15 (47)	17/27 (63)	12/14 (86)	2/3
<b>PGFA</b>	11/16 (69)	21/28 (75)	10/14 (71)	1/3
<b>Ki67</b>	18%	15%	21%	24%

**Tabla 12:** Relación entre patrones histológicos y variables IHQ. En naranja se señalan las asociaciones más destacadas. El resultado se expresa como número de casos positivos/número total de casos evaluados para cada PH y como porcentaje

Cuando se analizó la frecuencia de las alteraciones moleculares no IHQ (genéticas y epigenéticas) en los diferentes grupos de PH, se observó que los casos con PH-A mostraban los mayores niveles de *PDGFRAa* y eran los GB que más frecuentemente tenían *pMGMTmet*, mientras que los PH-B ponían de manifiesto los mayores niveles de *EGFRa* y de *EGFRvIII*. Los 3 casos de GB PH-D tenían *EGFRa* y sólo uno de ellos *EGFRvIII* (Tabla 13).

	PH-A (%)	PH-B (%)	PH-C (%)	PH-D
<b>EGFRa</b>	4/17 (24)	16/29 (55)	4/15 (27)	3/3
<b>EGFRvIII</b>	4/17 (24)	11/29 (38)	1/15 (7)	1/3
<b>PDGFRAa</b>	5/15 (33)	2/27 (7)	2/13 (15)	0/3
<b>pMGMTmet</b>	8/17 (47)	10/29 (34)	6/15 (40)	0/3

**Tabla 13:** Relación entre patrones histológicos y variables moleculares no IHQ. En naranja se señalan las asociaciones más destacadas. El resultado se expresa como número de casos positivos/número total de casos evaluados para cada PH y como porcentaje

Se estudió también la asociación entre cada una de las variables morfológicas analizadas y las variables IHQ (Tabla 14). Existía una relación con significación estadística entre la expresión de p53 y la presencia de CGM, de tal modo que los casos inmunopositivos para p53 mostraban presencia de CGM con una mayor prevalencia que los casos negativos ( $p=0,023$ ). Los casos que perdían PTEN presentaban ausencia de necrosis de tipo isquémico, ausencia de CGM y presencia de células pequeñas con más frecuencia que los casos con expresión de PTEN preservada, de manera significativa ( $p=0,046$ ,  $0,009$  y  $0,024$ , respectivamente). De entre los casos con necrosis con empalizada, el 84% tenían pérdida

de p16 ( $p=0,02$ ). Y lo mismo con los casos con ausencia de CGM: hasta en el 89% habían perdida la expresión de p16 ( $p<0,001$ ). Los casos negativos para PGFA tenían con mayor frecuencia un componente de célula pequeña ( $p=0,049$ ). Los GB con células pequeñas tenían un índice de Ki67 superior a los casos sin células pequeñas (31,9% y 22,2%, respectivamente) ( $p=0,022$ ).

En cuanto a la asociación entre variables morfológicas y variables moleculares no IHQ (Tabla 14), llama la atención la estrecha relación entre *EGFRa* y la existencia de necrosis con empalizada ( $p<0,001$ ), de tal modo que únicamente dos de los GB con *EGFRa* carecían de este hallazgo histológico. Esta misma asociación fue observada también para los casos con *EGRvIII* ( $p=0,031$ ), de modo que los casos con esta forma de *EGFR* tenían con alta frecuencia necrosis con empalizada. Existía además una relación con el componente de célula pequeña, de modo que, de entre los GB con *EGFRa*, el 55,6% tenían células pequeñas, mientras que esa proporción descendía al 30% en los que no tenían *EGFRa* ( $p=0,044$ ). Los casos con *EGFRa* y los casos con *EGFRvIII* carecían en su mayoría de CGM ( $p=0,04$  y  $p=0,035$ , respectivamente). Para *PDGFRAa*, por el contrario, no observamos relación alguna con ninguno de los parámetros morfológicos estudiados, excepto quizás apuntar que ninguno de los 9 casos amplificados mostró un componente de célula pequeña y todos tenían PMV, aunque es preciso recordar que la muestra de casos *PDGFRAa* es pequeña (sólo 9 casos). Para finalizar, cuando interrogamos la relación entre *pMGMTmet* y las variables morfológicas observamos que los pocos casos sin PMV tenían *pMGMTmet* ( $p=0,049$ ).

	Necrosis isquémica	Necrosis con empalizada	Proliferación microvascular	Células gigantes multinucleadas	Células pequeñas
<b>p53</b>				0,023	
<b>PTEN</b>	0,046			0,009	0,024
<b>p16</b>		0,02		<0,001	
<b>PGFA</b>					0,049
<b>Ki67</b>					0,022
<b>EGFRa</b>		<0,001		0,04	0,044
<b>EGFRvIII</b>		0,031		0,035	
<b>pMGMTmet</b>			0,049		

**Tabla 14:** Relación entre variables morfológicas y variables moleculares. Únicamente se señalan las asociaciones con significación estadística. Para simplificar la tabla se han omitido las variables CD44, Olig2, D2-40, PDGFRA, VIM y PDGFRAa, que no mostraron relaciones significativas. El número que aparece en la casilla corresponde al “valor p”. En negro se señalan las relaciones directas y en naranja las inversas

Entre nuestros casos observamos 3 GS, 3 GBCP, 2 GBCO y 2 GBME. Para el GS, las alteraciones más propias son la *PTENm*, *TP53m* y la delección de *CDKN2A* (Louis 2016). Dos de nuestros GS fueron negativos para p53 y p16 y sólo uno resultó negativo para PTEN. Diversos estudios describen como características moleculares propias de los GBCP la *EGFRa*, la delección de *CDKN2A* (p16) y la ausencia de mutaciones en *PTEN* (Homma 2006). En nuestra serie los 3 GBCP mostraron *EGFRa*, los 3 fueron inmunonegativos para p16 y sólo uno de los 3 fue negativo para PTEN. El GBCO ha sido retirado como entidad en la nueva clasificación de la OMS porque corresponde molecularmente a diferentes tipos de glioma de alto grado (Figarella-Branger 2015, Sahm 2014, Hinrichs 2016) por lo que puede presentar alteraciones muy variables y no se comentará nada más al respecto.

### **IV.4.3. Relación entre las diferentes variables moleculares**

El único caso con *IDH1m* mostró, además, inmunopositividad para p53, PTEN, CD44, Olig2, p16, D2-40 y VIM. No presentaba expresión de PDGFRA, PGFA, ni *EGFRa*, *EGFRvIII* o *PDGFRAa*, y curiosamente no tenía *pMGMTmet*. Su índice de proliferación celular fue del 51%.

Para el resto de los casos la relación entre las diferentes alteraciones moleculares se resume en la Tabla 15.

Para los marcadores IHQ se observó una relación positiva entre los casos con expresión de p53 y VIM. Así, de los 31 casos inmunopositivos para p53, 25 (el 80,6%) expresaban también VIM, mientras que únicamente eran positivos para VIM el 46,4% de los casos p53 negativos ( $p=0,006$ ). Observamos también una relación directa que casi alcanzó niveles de significación entre p53 y p16 ( $p=0,055$ ), de modo que la gran mayoría de casos inmunonegativos para p53 perdían la expresión de p16 (25/30 casos). La positividad para PTEN se relacionaba con una mayor positividad para D2-40, en tanto que la gran mayoría de casos Olig2 positivos habían perdido la positividad para p16 (30/37), aunque estas relaciones tampoco alcanzaron niveles de significación. La mayor parte de los casos positivos para CD44 eran también positivos para PGFA, mientras que los negativos para CD44 lo eran también para PGFA (82,4% y 90%, respectivamente) ( $p<0,001$ ).

En cuanto a la asociación entre variables moleculares IHQ y no IHQ, observamos una relación significativa entre *EGFRa* y PTEN, Olig2, p16 y *EGFRvIII*. Los casos con pérdida de PTEN y p16 tenían mayores frecuencias de *EGFRa* que los casos inmunopositivos

(64,7% vs 34,1% para PTEN, con una  $p=0,03$ ; y 56,8% vs 5,9% para p16, con una  $p<0,001$ ), mientras que para Olig2 la relación era directa: los casos con positividad para Olig2 presentaban mayores niveles de *EGFRa* (59,5% vs 16,7%) ( $p=0,001$ ). La práctica totalidad de los casos con *EGFRvIII* (15/17) tenían *EGFRa* ( $p<0,001$ ). Por último, entre los casos negativos para VIM observamos una mayor frecuencia de casos con *PDGFRAa* que entre los inmunopositivos (33% vs 5%) ( $p=0,01$ ).

	p53	PTEN	CD44	Olig2	p16	D2-40	VIM	PGFA	EGFRa	EGFRvIII	PDGFRAa
p53					0,055		0,006				
PTEN						0,059			0,030		
CD44								<0,001			
Olig2					0,053				0,001		
p16	0,055			0,053					<0,001		
D2-40		0,059									
VIM	0,006										0,01
PGFA			<0,001								
EGFRa		0,030		0,001	<0,001					<0,001	
EGFRvIII									<0,001		
PDGFRAa							0,01				

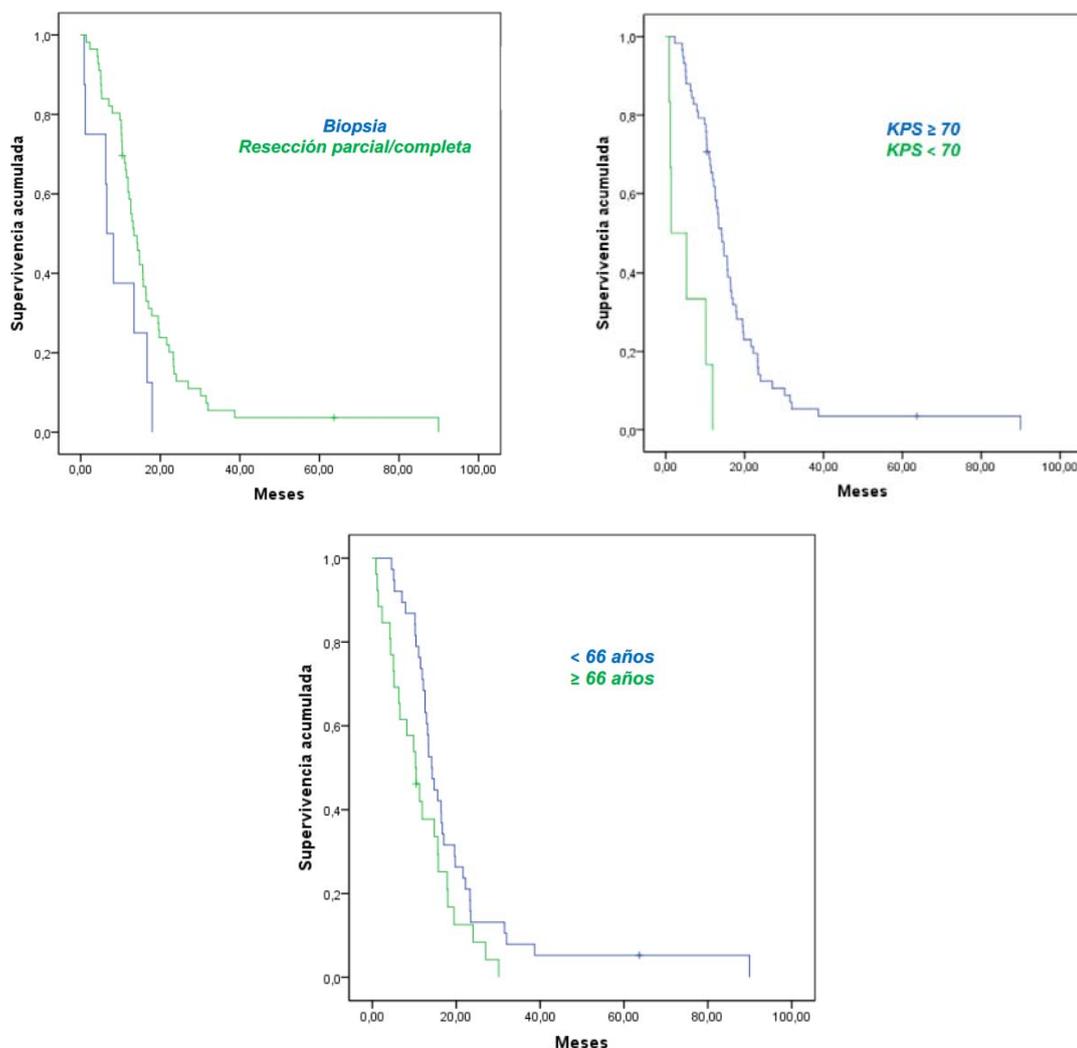
**Tabla 15:** Relación entre variables moleculares IHQ y no IHQ. Únicamente se señalan las asociaciones con significación estadística o algunas que casi alcanzaron la significación (en cursiva). Para simplificar la tabla se han omitido las variables *PDGFRA* y *pMGMTmet*, que no mostraron relaciones significativas. El número que aparece en la casilla corresponde al "valor p". En negro se señalan las relaciones directas y en naranja las inversas. (Por las características de la tabla los "valores p" se encuentran duplicados y aparecen en las columnas de las dos variables entre las que existe asociación)

#### IV.5. Variables y modelos de supervivencia

Se analizaron todas las variables clínicas, morfológicas y moleculares como posibles factores pronósticos de supervivencia (SG) en nuestra población de pacientes con GB. Se estudiaron las curvas de supervivencia con el modelo univariante, y se aplicó un modelo multivariante a todas aquellas variables que mostraron una significación estadística, o a aquellas variables de reconocido poder pronóstico.

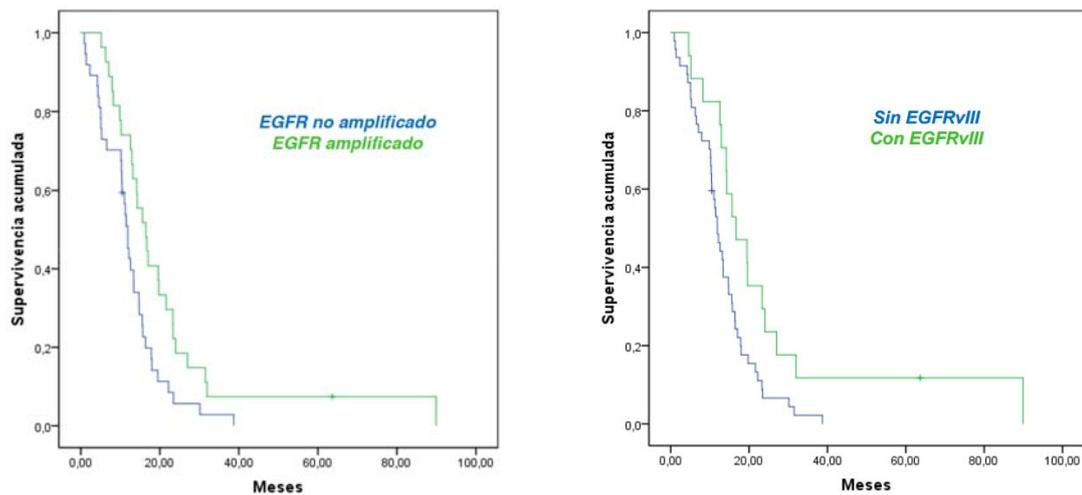
#### IV.5.1. Modelo univariante

Los análisis univariantes revelaron que, entre los factores clínicos, y tal y como se describe en la literatura, el tipo de cirugía (biopsia vs resección) y el KPS ( $\geq$  o  $<$ 70) influían de manera significativa en la SG de nuestros pacientes con GB. La mediana de SG de los pacientes con biopsia fue de 6,5 meses, frente a 13,3 meses en caso de resección parcial o completa ( $p=0,038$ , log-rank). De igual modo, los pacientes con KPS  $<$ 70 mostraban una SG inferior al resto de pacientes (mediana de 1,3 frente a 14,1 meses,  $p<0,001$ , log-rank). Si se definían los grupos según los estándares RPA de  $\geq$  o  $<$ 50 años, la edad no constituía un factor pronóstico en nuestra serie. Sin embargo, situando el punto de corte en 66 años ( $\geq$  o  $<$ 66 años) se encontraron diferencias en SG con significación estadística ( $p=0,034$ , log-rank), de modo que los pacientes con menos de 66 años vivían una mediana de 14,1 meses, frente a 10,3 meses para los mayores de 65 años (Figura 23).



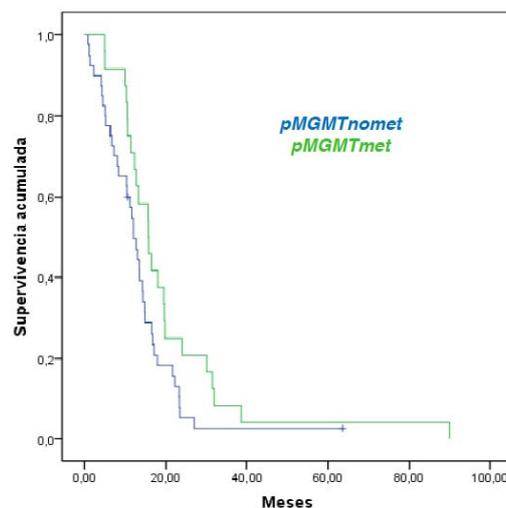
**Figura 23:** Curvas de supervivencia (SG) de Kaplan-Meier comparando los pacientes con diferente tipo de cirugía, KPS y edad

En nuestra serie, tanto *EGFRa* como *EGFRvIII* constituían factores de buen pronóstico con significación estadística. La mediana de supervivencia de los pacientes con GB con *EGFRa* fue de 16,5 meses, frente a 11,9 meses para los pacientes cuyos tumores no estaban amplificados ( $p=0,011$ , log-rank). Los pacientes con tumores con *EGFRvIII* tenían una mediana de SG de 16,7 meses, superior a los 11,9 meses para los pacientes sin *EGFRvIII* ( $p=0,014$ , log-rank) (Figura 24).



**Figura 24:** Curvas de supervivencia (SG) de Kaplan-Meier comparando los pacientes con GB con y sin amplificación de EGFR y los casos con y sin EGFRvIII

Se observó, también, una tendencia a la mayor SG en los casos con *pMGMTmet* (15,6 meses, frente a los 11,9 meses de SG mediana en los pacientes *pMGMTnomet*), que casi alcanzó niveles de significación estadística ( $p=0,053$ , log-rank) (Figura 25).



**Figura 25:** Curvas de supervivencia (SG) de Kaplan-Meier comparando los pacientes con tumores con y sin metilación del pMGMT

Ni las características histopatológicas ni el resto de las variables moleculares se relacionaron con la SG de un modo significativo, aunque observamos una tendencia hacia una supervivencia más prolongada en los casos con baja expresión de PTEN, CD44, D2-40 y PGFA y en los que mostraban altos niveles de Olig2 y PDGFRA. La presencia de necrosis con empalizada, el componente de células pequeñas y la ausencia de CGM eran, también, tres factores de buen pronóstico (sin alcanzar la significación estadística). De entre los diferentes PH, los GB que mostraban una mayor SG eran los GB de PH-B con una mediana de 14,2 meses (si no se consideraban, por el escaso número de casos, los GB de PH-D, que tenían una mediana de SG de 16,4 meses).

### **IV.5.2. Modelo multivariante**

En los análisis de supervivencia del tipo multivariante por modelo de regresión de Cox, en los que se contemplaron las variables tipo de cirugía (biopsia vs resección), KPS ( $\geq$  o  $<$ 70) y edad ( $\geq$  o  $<$ 66 años), ni *EGFRa* ni *EGFRvIII* constituían factores pronósticos independientes.

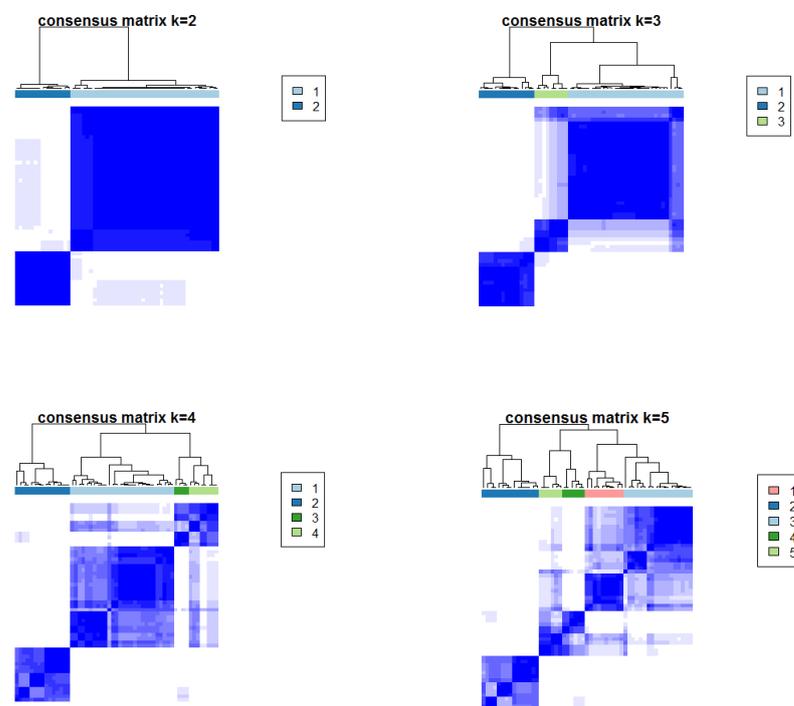
## **IV.6. Subgrupos moleculares de GB**

### **IV.6.1. Distribución de los casos en subgrupos de GB según un modelo de consensus clustering**

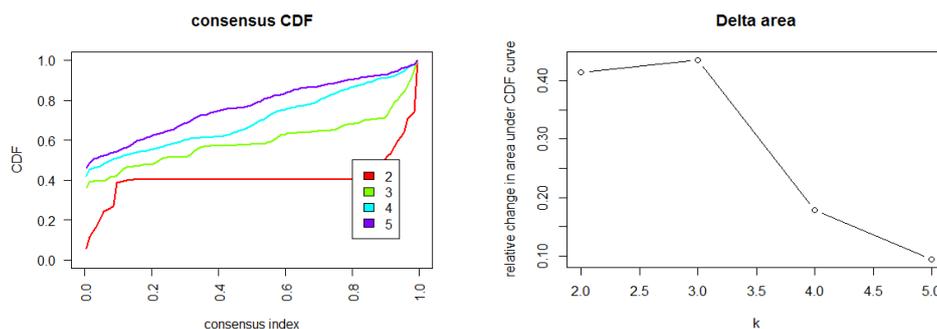
Con el objetivo de identificar subgrupos en nuestra población de GB, se aplicó un modelo de *consensus clustering* a nuestros datos moleculares (IHQ y no IHQ), tal y como hemos explicado en el apartado de materiales y métodos. Cabe resaltar que los resultados del estudio IHQ que se utilizaron para el modelo de *consensus clustering* no fueron los categorizados como positivos o negativos (a diferencia del criterio utilizado para el análisis de relación de variables), sino los obtenidos con las diferentes escalas de 0-1 a 3-5 para los marcadores que habían sido evaluados de este modo, tal y como se describió en materiales y métodos. De este modo, en el modelo se incluyeron los resultados de p53 (con valores de entre 0 y 4), CD44, Olig2, p16, D2-40, VIM y PGFA (con valores de entre 0 y 5), PDGFRA (valorado de 1 a 3) y de PTEN, *EGFRa*, *EGFRvIII* y *PDGFRAa* (valorados como positivos o negativos).

El modelo de *consensus clustering* permitió identificar diferentes subgrupos de GB en nuestra serie, con una estabilidad de agrupamiento que aumentaba de  $k=2$  a  $k=3$ , pero no para  $k=4$  o  $k=5$  (Figuras 26 y 27).

Con esta herramienta únicamente pudimos catalogar 55 de los 64 casos del estudio, porque en los 9 casos restantes la información molecular no estaba completa. Según este modelo de análisis de los datos, nuestra población podía dividirse, pues, en tres subgrupos (o *clusters*) de GB claramente diferenciados. Quince de los 55 casos (27,2%) correspondían a un subgrupo (que denominamos subgrupo A), 9 (16,3%) a otro (subgrupo B) y los restantes 31 (56,3%) a un tercero (subgrupo C).



**Figura 26:** Matrices del consensus clustering representadas como heatmaps (mapas de intensidad). En esta figura se muestran las diferentes matrices obtenidas con los 55 casos de  $k=2$  hasta  $k=5$ . Los sujetos se representan en ambas, filas y columnas. La imagen ilustra la presencia de diferentes subgrupos de GB, donde el área azul oscura identifica los casos que siempre se agruparon juntos, el área blanca los casos que nunca lo hicieron y las zonas con tonalidades azul más claro los casos con menor reproducibilidad de agrupación en las múltiples ejecuciones. Las matrices se han ordenado por subgrupos, más evidentes en los dendrogramas que aparecen sobre los heatmaps



**Figura 27.** Cumulative distribution function (CDF) para  $k=2$  hasta  $k=5$ . Este dato es uno de los parámetros a considerar para establecer el número óptimo de subgrupos. En la figura de la izquierda, la porción abajo a la izquierda representa los pares raramente agrupados juntos, mientras que la porción superior a la derecha representa los pares que prácticamente siempre se agrupan juntos. La porción central de la gráfica representa los pares con asignaciones ambiguas en las diferentes ejecuciones del algoritmo. El objetivo es identificar el menor número posible de asignamientos ambiguos. En la imagen de la derecha se observa la curva delta que representa la gráfica de progresión de la CDF, dibujando el cambio relativo del área bajo la curva CDF comparando  $k$  con  $k+1$ . El objetivo es seleccionar el  $k$  mayor que indujera el menor incremento en el área bajo la curva

#### IV.6.1.1. Características moleculares de los tres subgrupos de GB según el modelo de consensus clustering

En la Tabla 16 se resumen los resultados de los marcadores moleculares en los tres subgrupos mencionados. Como el objetivo del trabajo es ver si estos subgrupos pueden corresponderse con los subtipos de PEG de GB, en esta Tabla y en las que siguen se ha variado el orden en el que aparecen los marcadores moleculares y se han agrupado por probables marcadores de subtipos de GB: Olig2, p53, PDGFRA y PDGFRAa, como marcadores de subtipo proneural (PRN); EGFRa, EGFRvIII y p16, como marcadores de subtipo clásico (CLS); y CD44 y D2-40, como marcadores de subtipo mesenquimal (MES) (Motomura 2012, Verhaak 2010). El resto de marcadores IHQ y moleculares no se han asociado de forma clara en la literatura a un subtipo específico, por lo que constan al final de la lista.

	<b>Subgrupo A</b> (n=15) (%)	<b>Subgrupo B</b> (n=9) (%)	<b>Subgrupo C</b> (n=31) (%)
<b>Olig2</b>	6 (40)	7 (78)	22 (71)
<b>p53</b>	11 (73)	3 (33)	15 (48)
<b>PDGFRA</b>	11 (73)	4 (44)	20 (65)
<b>PDGFRAa</b>	3 (20)	0 (0)	6 (19)
<b>EGFRa</b>	1 (7)	5 (56)	20 (65)
<b>EGFRvIII</b>	2 (13)	4 (44)	10 (32)
<b>p16</b>	15 (100)	0 (0)	0 (0)
<b>CD44</b>	12 (80)	7 (78)	26 (84)
<b>D2-40</b>	8 (53)	0 (0)	27 (87)
<b>VIM</b>	10 (67)	6 (67)	18 (58)
<b>PGFA</b>	8 (53)	6 (67)	24 (77)
<b>PTEN</b>	12 (80)	4 (44)	23 (74)
<b>Ki67</b>	18,8%	17,6%	16,7%
<b>pMGMTmet</b>	5 (33)	5 (56)	10 (32)

**Tabla 16:** Características moleculares de los tres subgrupos de GB según el esquema de clasificación por consensus clustering. El resultado se expresa como número de casos positivos sobre el número total de casos evaluados en cada subgrupo molecular y como porcentaje

Los diferentes subgrupos mostraron diferencias en su perfil molecular (lo que constituía la base de la división en subgrupos). Así, por ejemplo, el subgrupo A mostraba una elevada frecuencia de casos con inmunopositividad para p53 y PDGFRA, y con *PDGFRAa*, marcadores de subtipo PRN. Entre los casos del subgrupo B se observaba una marcada prevalencia de casos con *EGFRa* y *EGFRvIII*, así como casos con pérdida de p16, marcadores todos ellos de subtipo CLS. En cambio, el subgrupo C se caracterizaba por un elevado número de casos con positividad para CD44 y D2-40, marcadores de subtipo MES. Con respecto a esos últimos marcadores de la lista a los que se hacía referencia anteriormente, cabe mencionar que los casos del subgrupo A mostraron los niveles más bajos de PGFA, en tanto que eran los GB del subgrupo B los que con mayor frecuencia perdían PTEN y tenían *pMGMTmet*. El índice de proliferación celular (Ki67) fue similar en los tres subgrupos.

#### **IV.6.1.2. Relación entre los subgrupos de GB según el modelo de consensus clustering y supervivencia**

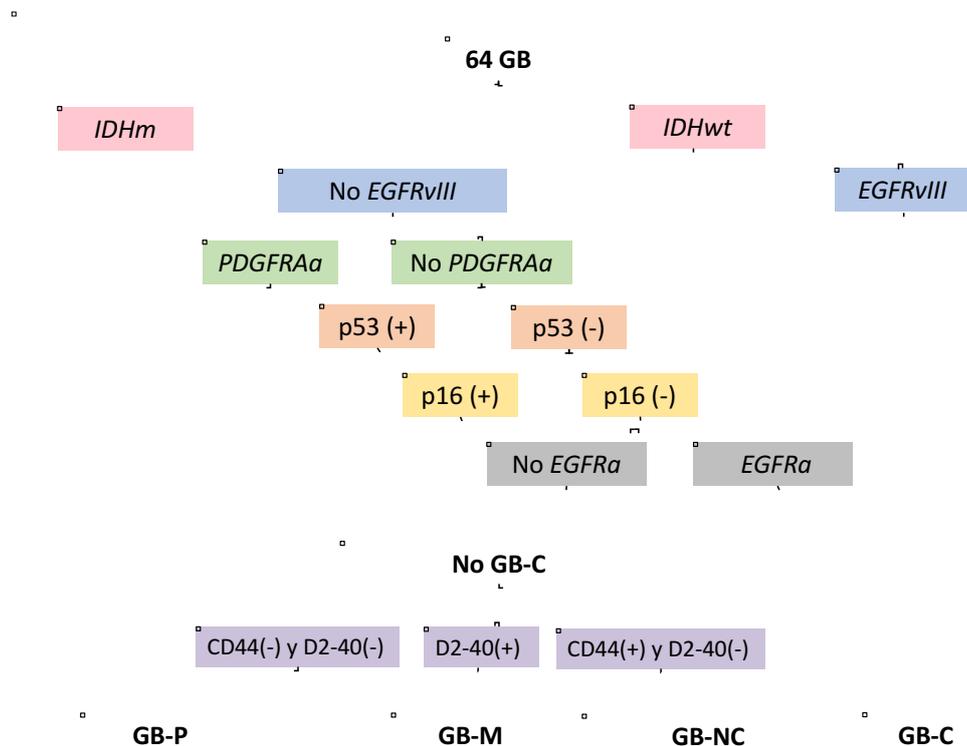
Aunque se observó una mayor SG entre los pacientes del subgrupo B (mediana de SG de 15,6 meses) que en el resto de subgrupos (13,4 meses y 12,5 meses para los subgrupos A y C, respectivamente), esta diferencia no alcanzó niveles de significación estadística.

#### **IV.6.2. Distribución de los casos en subgrupos de GB según un modelo tipo “árbol de decisión”**

En base a los resultados recientemente publicados por Brennan y col (Brennan 2013), en los que se detallan las principales alteraciones moleculares que subyacen a cada uno de los subtipos transcriptómicos de GB descritos por Verhaak y col (PRN, NEU, CLS y MES), se elaboró un algoritmo de clasificación a modo de “árbol de decisión” para dividir los casos de nuestra serie en tres subgrupos moleculares. A estos tres subgrupos moleculares los denominamos “GB tipo proneural” (GB-P), “GB tipo clásico” (GB-C) y “GB tipo mesenquimal” (GB-M). Además, se generó un cuarto subgrupo de “GB no clasificable” (GB-NC). Para elaborar este algoritmo de clasificación se utilizaron únicamente algunas de las variables moleculares que se habían analizado en el trabajo, escogiendo aquellas que se consideraron más específicas o sensibles (según el caso) de un determinado subtipo, como se comentará en el apartado de discusión. A diferencia de lo que se ha explicado para el agrupamiento por *consensus clustering*, para asignar los casos a los diferentes subgrupos de este modelo se consideraron las diferentes variables como variables dicotómicas, positivas o negativas. En el próximo párrafo se expone con detalle este “árbol de decisión”, que se ha representado gráficamente en la Figura 28.

El único caso con *IDHm* fue catalogado como GB-P. En un segundo tiempo todos los casos con *EGFRvIII* fueron catalogados como GB-C. De los casos restantes, aquellos que tenían *PDGFRAa* se catalogaron de GB-P. Únicamente se observó un caso con *EGFRvIII* y *PDGFRA*. Este caso era inmunonegativo para p53 y p16 y tenía *EGFRa*, por lo que se decidió catalogarlo como GB-C y no como GB-P. A continuación, a los casos aún no asignados a ningún subgrupo que mostraban o bien positividad para p53 (en un primer paso) o bien positividad para p16 (de entre los casos negativos para p53) o bien ausencia de *EGFRa* (de entre los negativos para p53 y p16) se les otorgó una categoría provisional de “GB no clásico” (podían ser GB-P, GB-M o GB-NC). De entre este último grupo, aquellos que mostraron negatividad para CD44 y D2-40 se catalogaron como GB-P, en tanto que los

que mostraron positividad para D2-40, con o sin positividad para CD44, se etiquetaron de GB-M. El resto de los casos constituyen el grupo de los GB-NC.



**Figura 28:** Algoritmo de decisión utilizado para clasificar los casos de GB en subgrupos moleculares (En la figura se ha denominado “No GB-C” al grupo provisional de “GB no clásico”)

Con esta distribución 12 de los 64 casos resultaron GB-P (18,8%), 17 casos GB-C (26,6%), 20 casos GB-M (31,2%) y 11 casos GB-NC (17,2%). En el resto de los casos no se disponía de la información molecular necesaria para aplicar este algoritmo y constituyen el grupo de los casos no valorables (4 casos).

#### IV.6.2.1. Características moleculares de los tres subgrupos de GB según el modelo tipo “árbol de decisión”

Dado que para definir los subgrupos GB-P, GB-C, GB-M y GB-NC habíamos utilizado los resultados dicotomizados de algunas de las variables, el análisis de la frecuencia de cada una de las variables moleculares en cada uno de los subgrupos de GB, tal y como se describió anteriormente para los subgrupos de GB por *consensus clustering*, debía hacerse con cautela, y quizás restringirse a las variables que no habían sido empleadas o a las que aparecían más tardíamente en el algoritmo de clasificación. No obstante, y en un intento de

homogeneizar la presentación de los resultados con los mostrados para el modelo de agrupamiento por *consensus clustering*, en la Tabla 17 se han recogido todas las variables.

	<b>GB-P</b> (%)	<b>GB-C</b> (%)	<b>GB-M</b> (%)	<b>GB-NC</b> (%)
<b>Olig2</b>	8 (67)	11 (69)	10 (50)	8 (73)
<b>p53*</b>	7 (58)	5 (31)	15 (75)	4 (36)
<b>PDGFRA</b>	8 (67)	11 (69)	11 (58)	6 (55)
<b>PDGFRAa*</b>	8 (67)	1 (6)	0 (0)	0 (0)
<b>EGFRa*</b>	3 (25)	15 (88)	6 (30)	3 (27)
<b>EGFRvIII*</b>	0 (0)	17 (100)	0 (0)	0 (0)
<b>p16</b>	6 (50)	2 (13)	5 (25)	3 (27)
<b>CD44</b>	8 (67)	13 (81)	18 (90)	10 (91)
<b>D2-40*</b>	6 (50)	10 (63)	20 (100)	2 (18)
<b>VIM</b>	6 (50)	11 (69)	15 (79)	4 (40)
<b>PGFA</b>	5 (42)	11 (69)	16 (80)	9 (82)
<b>PTEN</b>	8 (67)	9 (56)	17 (85)	8 (73)
<b>Ki67</b>	22,4%	16,9%	16,7%	16,6%
<b>pMGMTmet</b>	5 (42)	6 (35)	7 (35)	4 (36)

**Tabla 17:** Características moleculares de los cuatro subgrupos de GB según el esquema de clasificación tipo “árbol de decisión”. En naranja se han marcado las alteraciones moleculares utilizadas en el algoritmo de clasificación, muchas de las cuales, como cabe esperar, se asociaban de manera significativa (marcadas con un asterisco) a los diferentes subgrupos de GB. (En esta tabla el número total de casos de GB-P, GB-C, GB-M y GB-NC es variable para cada marcador y no siempre igual a 12, 17, 20 y 11, respectivamente)

Evidentemente *EGFRvIII* sólo aparecía en los casos de GB-C, pues constituía uno de los primeros nodos del “árbol de decisión”. Y lo mismo pasaba con *PDGFRAa*, aunque, como ya se ha comentado con anterioridad, había un caso que también tenía *EGFRvIII* y que se clasificó como GB-C. Los siguientes nodos de decisión fueron la positividad para p53 y p16 y la ausencia de *EGFRa*, que permitían definir un subgrupo provisional de “GB no clásico”. Por ello se observaron niveles bajos de p53 y p16 y niveles altos de *EGFRa* en el grupo de GB-C. No obstante, se puede observar que, entre los restantes subgrupos, los GB-M mostraron mayores títulos de p53, *EGFRa* y mayor frecuencia de pérdida de p16 que los GB-P. También por el propio diseño del algoritmo de clasificación, los mayores niveles de D2-40 se observaron en el subgrupo de GB-M y los menores niveles de CD44 y D2-40 en el subgrupo de GB-P. Además, entre los GB-C había menos casos positivos para CD44 que entre los GB-M. En cuanto al resto de los marcadores no incluidos en el “árbol de decisión”, Olig2 y PDGFRA predominaban entre los casos de GB-C, aunque sus niveles

eran muy similares en todos los subgrupos, y los GB-M mostraban una mayor prevalencia de casos positivos para VIM y PGFA. Los mayores niveles de pérdida de PTEN se observaron en el subgrupo GB-C y los mayores de *pMGMTmet* en los GB-P. El mayor índice de proliferación celular se observó entre los casos de GB-P. Como se detalla en la Tabla 17 ninguna de estas últimas asociaciones alcanzó una significación estadística.

#### ***IV.6.2.2. Características clínicas y morfológicas de los tres subgrupos de GB según el modelo tipo “árbol de decisión”***

Toda la información referente a este apartado se ha resumido en la Tabla 18.

##### ***IV.6.2.2.1. “GB tipo proneural”***

Siguiendo este esquema de clasificación, los GB-P eran más frecuentes entre los hombres (66,7%), con una mediana de edad de 58 años, afectaban más frecuentemente al lóbulo frontal (33,3%) que al resto de localizaciones cerebrales y asentaban con igual frecuencia en el hemisferio derecho e izquierdo. Hasta el 25 % de los tumores eran multifocales. Si se analizaba la mediana edad del subgrupo GB-P sin tener en cuenta el único caso de GB-IDHm, ésta era de 59 años.

Dos de los 3 casos catalogados como GS, uno de los dos GCO y un GBME pertenecían a este subgrupo, siendo el patrón morfológico más frecuente entre estos GB el PH-A (41,7%). El 91,7% de los casos del subgrupo GB-P mostraban necrosis isquémica y el 50% necrosis con empalizada. En el 91,7% de los casos observamos PMV y en el 50% había CGM. El 42% de los casos tenían un componente de células pequeñas.

##### ***IV.6.2.2.2. “GB tipo clásico”***

Los GB-C eran más prevalentes, de nuevo, entre los hombres (58,8%), con una mediana de edad de 63 años, afectaban más frecuentemente al lóbulo frontal (41,1%) y al hemisferio derecho (82,4%) y, hasta en el 17,6%, eran multifocales.

Uno de los 3 casos catalogados como GBCP y uno de los dos GBME pertenecían a este subgrupo y el patrón morfológico más común entre estos GB fue el PH-B (64,7%). El 94,1% de los casos del subgrupo GB-C mostraban necrosis isquémica y el 88,2% necrosis con

empalizada. En el 100% de los casos observamos PMV y en el 17,6% había CGM. El 47% de los casos tenían un componente de células pequeña.

#### ***IV.6.2.2.3. “GB tipo mesenquimal”***

Los GB-M eran más frecuentes entre las mujeres (65%), con una mediana de edad de 65 años y afectaban sobre todo al lóbulo temporal (45%) y al hemisferio derecho (60%). El 5% de los casos de GB-M eran multifocales.

Uno de los 3 casos catalogados como GS, uno de los 3 GBCP y uno de los GBCO pertenecían a este subgrupo y el patrón morfológico más frecuente entre estos GB fue el PH-B (55%), si bien muchos de los GB con PH-C (42%) correspondían a GB-M. El 90% de los casos mostraban necrosis isquémica y el 70% necrosis con empalizada. En el 95% de los casos observamos PMV y en el 45% había CGM. El 40% de los casos tenían un componente de células pequeñas.

#### ***IV.6.2.2.4. “GB tipo no clasificable”***

Los GB-NC eran más frecuentes entre los hombres (54,5%), con una mediana de edad de 67 años, afectaban con mayor frecuencia al lóbulo frontal (36,4%) y asentaban habitualmente en el hemisferio izquierdo (63,6%). El 18,2% eran tumores multifocales.

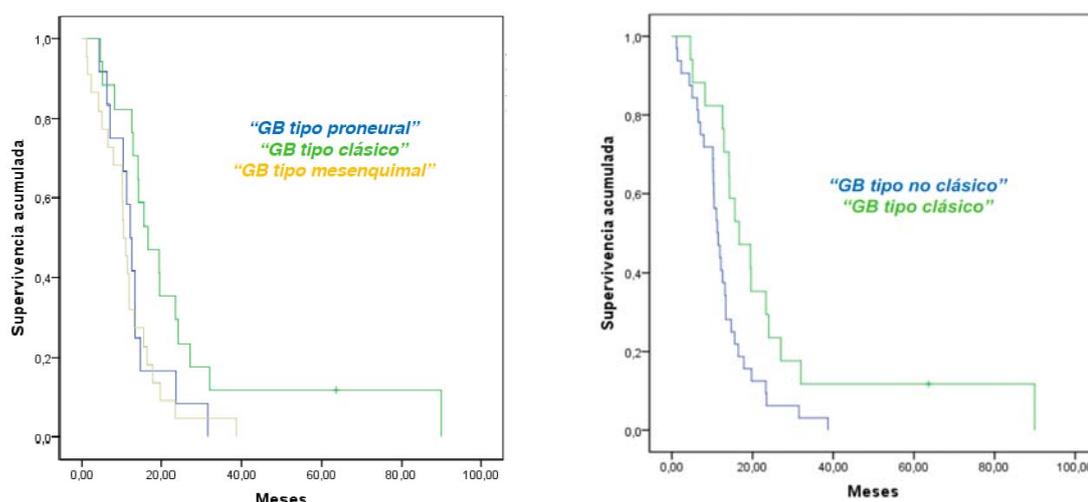
Uno de los 3 casos catalogados como GBCP pertenecía a este grupo y el patrón morfológico más frecuente entre estos GB fue el PH-A (36,4%). El 81,8% de los casos del subgrupo GB-NC mostraban necrosis isquémica y el 72,7% necrosis con empalizada. En el 90,9% de los casos se observó PMV y en el 27,3% había CGM. El 36,4% tenían un componente de células pequeñas.

	GB-P (n=12) (%)	GB-C (n=17) (%)	GB-M (n=20) (%)	GB-NC (n=11) (%)
Relación hombre/mujer	8/4	10/7	7/13	6/5
Edad mediana al diagnóstico	58a	63a	65a	67a
Lóbulo afecto (frontal/temporal)	4/3	7/3	7/9	4/2
Lateralidad (derecha/izquierda)	6/6	14/3	12/8	4/7
Multifocalidad	3 (25)	3 (18)	1 (5)	2 (18)
Patrón histológico (A/B/C/D)	5/3/4/0	4/11/1/1	3/11/5/1	4/3/3/1
GS/GBCP/GBCO/GME	2/0/1/1	0/1/0/1	1/1/1/0	0/1/0/0
Necrosis isquémica	11 (92)	16 (94)	18 (90)	9 (82)
Necrosis con empalizada*	6 (50)	15 (88)	14 (70)	8 (73)
Proliferación microvascular	11 (92)	17 (100)	19 (95)	10 (91)
Células gigantes multinucleadas*	6 (50)	3 (18)	9 (45)	3 (27)
Células pequeñas	5 (42)	8 (47)	8 (40)	4 (36)

**Tabla 18:** Características clínicas y morfológicas de los cuatro subgrupos de GB según el esquema de clasificación tipo “árbol de decisión”. El resultado se expresa como número de casos positivos sobre el número total de casos evaluados en cada subgrupo molecular y como porcentaje. (El asterisco marca las asociaciones que resultaron significativas con una  $p=0,010$  para la necrosis con empalizada y una  $p=0,026$  para el componente de CGM). (GS: gliosarcoma; GBCP: GB de células pequeñas; GBCO: GB con componente oligodendroglial; GME: GB con metaplasia epitelial)

#### IV.6.2.3. Relación entre los subgrupos de GB según el modelo tipo “árbol de decisión” y supervivencia

Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier mostraron que los pacientes con diferentes tipos de GB (GB-P, GB-C y GB-M) tenían supervivencias significativamente diferentes ( $p=0,038$ , log-rank). Los pacientes con mayor SG eran los pacientes que presentaban GB-C (mediana de 16,7 meses), seguidos de los GB-P (12,2 meses) y, en último lugar, los GB-M (10,4 meses) (Figura 29). Los GB-NC vivían una mediana de 17 meses. Si se analizaban los datos sin tener en cuenta el paciente con GB-IDHm, los resultados resultaban similares y con una significación aún mayor ( $p=0,035$ , log-rank). Cuando se compararon los subgrupos de GB de dos en dos se observó que existían diferencias significativas entre el subgrupo de GB-C y el subgrupo de GB-P ( $p=0,19$ , log rank) y entre el subgrupo de GB-C y el subgrupo de GB-M ( $p=0,18$ , log rank), mientras que no existía diferencia en SG entre los subgrupos GB-P y GB-M. A continuación, se agruparon los casos de GB-P y de GB-M y se comparó la SG de este grupo con la del subgrupo GB-C, obteniéndose una diferencia significativa ( $p=0,011$ , log-rank) (Figura 29).



**Figura 29:** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier comparando los pacientes con GB-P, GB-C y GB-M y los pacientes con GB-C con el resto de los casos (GB-P o GB-M)

En el análisis de supervivencia del tipo multivariante por modelo de regresión de Cox, el hecho de pertenecer al subgrupo GB-C constituía un factor de buen pronóstico independiente de las variables tipo de cirugía (biopsia vs resección), KPS ( $\geq$  o  $<70$ ) y edad ( $\geq$  o  $<66$  años) (Tabla 19). Al introducir en el modelo *EGFRa*, la variable GB-C vs resto de GB (GB-P o GB-M) perdía su significación debido, seguramente, a la relación significativa que observamos entre el subgrupo GB-C y *EGFRa*.

Variable	Hazard Ratio	Intervalo de confianza del 95%	p
Tipo de cirugía (biopsia vs resección)	3,115	1,227-7,906	0,017
KPS ( $\geq$ o $<70$ )	0,80	0,019-0,329	$<0,001$
Edad ( $\geq$ o $<66$ años)	3,031	1,574-5,836	0,001
GB-C	2,785	1,426-5,441	0,003

**Tabla 19:** Datos sobre el modelo de regresión de Cox multivariante con la variable subgrupo GB-C

#### IV.6.3. Relación entre los subgrupos de GB según el modelo de consensus clustering y según el modelo tipo “árbol de decisión”

Se analizó la relación que existía entre ambas clasificaciones del GB en subgrupos moleculares, la obtenida por *consensus clustering* y la resultante de nuestro algoritmo de

clasificación, y se observó una correlación con significación estadística ( $p=0,037$ ). Así, entre los casos del subgrupo A una gran parte eran GB-P (y también GB-M), la mayoría de los casos del subgrupo B eran GB-C y los del subgrupo C eran frecuentemente GB-M. En cuanto a los GB-NC, la mayor parte de los casos habían sido clasificados como subgrupo B (Tabla 20). Si se excluían del análisis los casos de GB-NC, la correlación perdía significación ( $p=0,079$ ) pero se seguía observando una tendencia a la relación de tal modo que entre los casos del subgrupo A muchos eran GB-P, en el subgrupo B la mayoría eran GB-C y en el subgrupo C la mayoría eran GB-M (Tabla 21).

	GB-P	GB-C	GB-M	GB-NC
<b>Subgrupo A</b> (n=15) (%)	5 (33)	2 (13)	5 (33)	3 (20)
<b>Subgrupo B</b> (n=9) (%)	1 (11)	4 (44)	0 (0)	4 (44)
<b>Subgrupo C</b> (n=31) (%)	5 (16)	10 (32)	13 (42)	3 (10)

**Tabla 20:** Relación entre los subgrupos de GB según el modelo de consensus clustering y los subgrupos de GB según el modelo tipo “árbol de decisión” (GB-P, GB-C, GB-M y GB-NC). El resultado se expresa como número de casos positivos sobre el número total de casos evaluados en cada subgrupo molecular (A, B y C) y como porcentaje

	GB-P	GB-C	GB-M
<b>Subgrupo A</b> (n=12) (%)	5 (42)	2 (17)	5 (42)
<b>Subgrupo B</b> (n=5) (%)	1 (20)	4 (80)	0 (0)
<b>Subgrupo C</b> (n=28) (%)	5 (18)	10 (36)	13 (46)

**Tabla 21:** Relación entre los subgrupos de GB según el modelo de consensus clustering y los subgrupos de GB según el modelo tipo “árbol de decisión” (GB-P, GB-C y GB-M). El resultado se expresa como número de casos positivos sobre el número total de casos evaluados en cada subgrupo molecular (A, B y C) y como porcentaje



## ***V. Discusión***



Dado que el principal objetivo del presente estudio ha sido establecer subgrupos moleculares de GB que remeden los subtipos transcriptómicos descritos en la literatura, así como evaluar si esta clasificación pudiera resultar de utilidad clínica, se dedicará la primera parte de este apartado a la discusión de los resultados obtenidos a este respecto. Posteriormente, se comentarán el resto de resultados que conciernen a los objetivos secundarios, así como otros hallazgos que creemos pudieran ser de interés.

### V.1. Subgrupos moleculares de GB

El GB constituye la neoplasia maligna primaria cerebral más frecuente en la población adulta. Con el tratamiento actual, basado en la combinación de radioterapia (RT) con temozolomida (TMZ), únicamente el 5% de los pacientes sobreviven más de 5 años (Ostrom 2014). La metilación del promotor de MGMT (*pMGMTmet*) constituye un marcador de respuesta al tratamiento con TMZ (Hegi 2005), pero la ausencia de tratamientos alternativos hace que este biomarcador tenga poca relevancia clínica. Existe, pues, una necesidad imperiosa de mejorar el tratamiento en los pacientes con GB. Esta mejora podría beneficiarse del descubrimiento de nuevos biomarcadores que permitan seleccionar el tratamiento más adecuado para cada paciente.

Los estudios de secuenciación masiva han permitido detectar alteraciones genéticas específicas tributarias de tratamientos diana en un gran número de neoplasias humanas. Un ejemplo de ello sería la presencia de mutaciones de *EGFR* en algunos casos de adenocarcinoma de pulmón como diana molecular para el tratamiento con inhibidores de los receptores de las tirosín-cinasas (Lynch 2004, Paez 2004). En esta línea, son muchos los trabajos que han descrito en detalle cuáles son las alteraciones moleculares que subyacen al origen y la progresión del GB (Bredel 2009, Cerami 2010, Li 2009, Liang 2005, Mischel 2003, Noushmehr 2010, Nutt 2003, Parsons 2008, Phillips 2006, Rich 2005, TCGA 2008, Verhaak 2010). De hecho, el GB fue el primer tumor estudiado en el proyecto TCGA (del inglés *The Cancer Genome Atlas*), una iniciativa conjunta del Instituto Nacional de Cáncer y del Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano que nació con el objetivo de crear un atlas de las principales alteraciones moleculares que subyacen a los diferentes tipos de neoplasia (TCGA 2008). En la actualidad el TCGA ha analizado más de 500 casos de GB en términos de expresión génica y alteraciones en el número de copias, secuenciación de exomas, análisis de microRNA y perfiles de metilación (Brennan 2013).

Una de las principales aportaciones de todos estos estudios a gran escala ha sido la identificación de diferentes subtipos transcriptómicos (o subtipos de perfiles de expresión

génica, PEG) de GB que muestran diferencias en la supervivencia y en la respuesta al tratamiento. Uno de los trabajos más relevantes en este campo es el que publicaron Verhaak y col en el año 2010. Estos autores describen la existencia de cuatro subtipos de GB, a los que denominan proneural (PRN), neural (NEU), clásico (CLS) y mesenquimal (MES), que muestran diferente curso clínico y presentan diferentes tipos de alteraciones moleculares (más allá de la diferencia en la expresión génica) (Verhaak 2010). El empleo de plataformas que analizan, también de manera masiva, los niveles de metilación del ADN, ha permitido diferenciar un quinto subtipo de GB, el subtipo hipermetilador (o G-CIMP, del inglés *Glioma CpG Island Methylator Phenotype*), denominado así porque los tumores con este perfil muestran metilación en las islas CpG de un gran número de genes. Este subtipo se corresponde de manera casi perfecta con los actuales GB-IDHm que, por definición, son GB PRN. Por tanto, el subtipo GB G-CIMP constituye un subgrupo dentro de los GB PRN (Noushmehr 2010).

Estas metodologías de “alto rendimiento” (como los análisis de secuenciación masiva o los análisis de expresión génica con micromatrices), aunque cada día más cercanos a los departamentos de patología, no constituyen, a día de hoy, una herramienta accesible para la clasificación de los pacientes con GB en la práctica clínica diaria. Además, estos análisis presentan limitaciones, tales como la necesidad de disponer de material congelado, un bien escaso cuando hablamos de muestras de tumores cerebrales. Es por ello que algunos autores han ensayado la aplicación de otras metodologías para este fin, como, por ejemplo, el empleo de paneles de marcadores inmunohistoquímicos (IHQ) (Conroy 2014, Le Mercier 2012, Motomura 2012, Popova 2014). La IHQ, que constituye una técnica disponible en la práctica totalidad de los servicios de patología, es económica y aplicable a material incluido en parafina. Además, los patólogos tenemos décadas de experiencia en su interpretación.

En esta línea, en el presente trabajo se ha analizado un panel de marcadores moleculares detectables mediante técnicas empleadas habitualmente en los servicios de anatomía patológica, con la idea de reproducir la clasificación del GB en los subtipos descritos por Verhaak y col. Para elaborar un modelo de clasificación con los datos obtenidos de este análisis se han ensayado dos aproximaciones: una más matemática, utilizando una metodología de *consensus clustering*, y un modelo más racional, con la aplicación de un “árbol de decisión” diseñado en base a los datos publicados por Brennan y col (Brennan 2013).

Con respecto al primer punto, se empleó una metodología similar a la descrita por Motomura y col (Motomura 2012). Estos autores analizaron un panel de marcadores IHQ, que habían

seleccionado en base a los resultados publicados en los trabajos de Phillips y col y de Verhaak y col (Phillips 2006, Verhaak 2010), en una serie de 76 casos de GB. Con los resultados de estos análisis elaboraron un modelo de *consensus clustering* y describieron la existencia de cuatro subgrupos de GB que, postulan, podrían corresponderse con los subtipos de GB de Verhaak. En el presente estudio se ha empleado esta misma metodología de *consensus clustering* en una serie de 64 pacientes con GB y, de este modo, se han descrito tres subgrupos de GB, que se han denominado como subgrupos A, B y C. Estos subgrupos también mostraron similitudes con los subtipos PRN, CLS y MES de Verhaak.

Son varias las consideraciones a tener en cuenta sobre nuestro modelo de *consensus clustering*, que dificultan la comparación de nuestros resultados con los obtenidos por Motomura y col.

Para empezar, hemos obviado el uso de marcadores que permitieran diferenciar un subgrupo de GB similar al subtipo NEU de Verhaak. Aunque en un primer momento se incorporó al trabajo el análisis IHQ de la expresión de sinaptofisina (SINA) como marcador de subtipo NEU, creemos que la interpretación de esta IHQ en los casos de GB no constituye un dato objetivo para ser considerado en un modelo de clasificación. En muchos de los casos positivos para SINA el patrón de tinción era altamente sugestivo de corresponder a neuropilo sano atrapado entre las células neoplásicas, siendo muy difícil interpretar si existía algún tipo de expresión real por parte del componente neoplásico o qué porcentaje de la inmunotinción era atribuible al mismo. Además, y en consonancia con esto, la tendencia actual es a considerar que el GB subtipo NEU probablemente no exista y que, en realidad, constituye una contaminación de la muestra analizada por tejido no tumoral atrapado entre las células neoplásicas, un hecho sumamente frecuente y que le vale el nombre al grupo de los gliomas infiltrantes (GI) (Wirsching 2016). Hay que tener en cuenta que la práctica totalidad de los estudios de PEG en GB se han realizado con material congelado y que en estos trabajos no se detalla si en algún momento se revisó la histología de la muestra congelada. De hecho, el propio Verhaak describe que los dos casos de cerebro no tumoral que analizaron en su serie fueron clasificados junto a los casos de GB subtipo NEU, y que 25 de sus 33 GB subtipo NEU contenían células no tumorales atrapadas “en las secciones de patología”, que creemos se refiere, en realidad, a las secciones de los bloques fijados en formol e incluidos en parafina de los casos. Estos mismos autores no observaron tampoco ningún GB de estas características entre los tumores que crecieron en ratones atómicos. Brown y col tampoco encuentran ningún caso de GB subtipo NEU entre los tumores derivados de GB humanos que implantaron en el tejido subcutáneo (implantes

extracraneales) en 20 ratones atímicos (Brown 2015). Los estudios más recientes de clasificación molecular del GB, como el publicado por Sturm y col en 2012 (Sturm 2012), de igual modo que la mayoría de los trabajos que ensayan paneles IHQ para reproducir los subtipos de GB (Conroy 2014, Le Mercier 2012, Popova 2014), no contemplan la existencia de un subtipo NEU en sus series. Ni siquiera Motomura encuentra que ninguno de sus cuatro subgrupos de GB constituya el correlato del subtipo NEU de Verhaak (Motomura 2012). Por todo lo anteriormente expuesto, se decidió no considerar la expresión de SINA para los análisis posteriores y se escogió un modelo con tres y no con cuatro subgrupos para la clasificación de nuestros casos de GB por *consensus clustering*. Aunque existen métodos matemáticos que ayudan a decidir cuál es el número óptimo de grupos para los modelos de *consensus clustering*, en muchas ocasiones existirían varias opciones correctas. En esos casos, el investigador puede decidir entre las diferentes posibilidades que el modelo propone. En este trabajo, las posibilidades que el modelo ofrecía eran de 2 a 4 grupos, aunque el propio modelo, tal y como se ha explicado en el apartado de resultados, ya indicaba que probablemente la opción más correcta era dividir la muestra en 3 grupos.

Continuando con las consideraciones que dificultan la comparación de los resultados, cabe resaltar que los marcadores que se eligieron para este trabajo no son exactamente los mismos que emplearon Motomura y col. A diferencia de lo que describieron estos autores, se incorporaron datos moleculares no IHQ al modelo de *consensus clustering*, como el análisis de la *EGFRa* y la *PDGFRAa* (mediante FISH) y el estudio de la forma *EGFRvIII* (analizada por RT-PCR). Esta decisión obedece al hecho de que son estas alteraciones (y no la expresión proteica de EGFR, PDGFRA o EGFRvIII) las que Verhaak y col describen como diferenciales en su clasificación del GB por PEG, que es la clasificación que buscábamos reproducir (Verhaak 2010). La incorporación de los datos genéticos a los datos IHQ en los modelos de *consensus clustering* ya ha sido previamente empleada por algunos autores que también han ensayado modelos de clasificación en GB (Conroy 2014).

Los marcadores IHQ analizados en este estudio tampoco coinciden exactamente con los que utilizaron Motomura y col. De su lista de 16 marcadores, se escogieron, en primer lugar, los marcadores con tinción nuclear, como Olig2, p53 y p16 (que muestra tinción nuclear y citoplasmática). Creemos que la interpretación y cuantificación de la tinción IHQ con marcadores nucleares entraña una menor complejidad y es más reproducible que la tinción con marcadores citoplasmáticos. Más allá de Olig2, p53 y p16, el resto de marcadores que se emplean en el estudio de Motomura son de tinción puramente citoplasmática (a excepción de IDH1-R132H, del que se hablará posteriormente) (Motomura 2012). En nuestra opinión,

la valoración IHQ de un marcador con tinción citoplasmática en el contexto de un GI es un modelo que adolece de una marcada subjetividad. La mala delimitación del citoplasma de la célula tumoral, que forma largos procesos que se extienden mucho más allá de la región perinuclear, hace imposible individualizar las células tumorales y, por tanto, supone una limitación para decidir cuál sería el porcentaje de células positivas para un determinado marcador IHQ. Por ello se intentó reducir el número de marcadores IHQ empleados con tinción de citoplasma.

De entre este grupo de marcadores citoplasmáticos, se escogieron D2-40 y CD44 por no disponer de otro tipo de marcadores para el subtipo MES. De entre los diferentes marcadores IHQ de subtipo MES se eligieron estos dos porque, en el trabajo de Motomura y col, D2-40 y CD44 son los marcadores que permiten definir mejor el subgrupo *AsMes* (el supuestamente MES) y diferenciarlo del resto de subgrupo (Motomura 2012).

Se exploró la expresión IHQ de PDGFRA, un supuesto marcador de subtipo PRN de tinción citoplasmática, para compararla con la *PDGFRAa*, y se incorporaron los resultados con ambos marcadores al modelo de *consensus clustering*. De igual modo, Conroy y col incluyeron los resultados de la *EGFRa* y la IHQ para EGFR a su modelo de análisis de los datos (Conroy 2014).

Se añadió el estudio de la expresión de PTEN porque constituye un marcador de fácil y reproducible interpretación si se evalúa comparando la tinción de las células tumorales con la observada en las células endoteliales de la misma muestra (Wiencke 2007). Aunque la expresión IHQ de PTEN no se incluye en el trabajo de Motomura y col, otros autores que han ensayado modelos de clasificación IHQ de GB sí lo han incluido en su lista (Conroy 2014).

Nos pareció interesante explorar si marcadores como PGFA y VIM, de uso frecuente en el diagnóstico de los gliomas, podían mostrar una expresión diferencial en los distintos subgrupos de GB. Motomura y col analizaron la expresión IHQ de PGFA y Conroy y col estudiaron la expresión de VIM, y en ambas situaciones los resultados se incluyeron en los modelos de *consensus clustering* (Motomura 2012, Conroy 2014). Le Mercier y col incluyen en su trabajo el estudio de la expresión IHQ de PGFA y VIM únicamente como controles de la antigenicidad de sus muestras (Le Mercier 2012).

Para finalizar, se exploró la inmunotinción para IDH1-R132H, pero, al no encontrar ningún caso inmunopositivo, esta variable se eliminó de la lista de marcadores para el modelo de

*consensus clustering*. Tampoco se incluyó el estudio de secuenciación de *IDH* porque únicamente un caso en nuestra serie presentó mutación. Un único paciente con una alteración molecular es difícil de asignar a un grupo de un modelo de *consensus clustering*.

La utilización de TMA en esta serie supone, también, una diferencia con el estudio de Motomura y col, que utiliza secciones completas del tumor. La utilización de TMA para los estudios IHQ y de FISH conlleva una serie de ventajas, como, por ejemplo, la homogeneización de los diferentes aspectos técnicos en todos los casos, así como un considerable ahorro de tejido (Ilyas 2013). Este último punto es de gran importancia, pues permite incluir en estos análisis pacientes en los que únicamente se haya podido realizar una biopsia. Con ello se evitaría sesgar la población a estudiar, que, de requerir mayores cantidades de tejido para los múltiples análisis moleculares, podría estar constituida únicamente por tumores situados en determinadas áreas del cerebro, tributarios de una resección quirúrgica más extensa. Un problema que plantean frecuentemente los estudios con TMA es el tema de la heterogeneidad de tinción (por la propia heterogeneidad tumoral) y cómo valorar aquellos casos en los que los diferentes cilindros del TMA que corresponden a un mismo tumor muestran puntuaciones diferentes para un determinado evento molecular. En el presente trabajo, para solventar este problema, que únicamente se observó con algunos de los marcadores IHQ, se escogió el valor más prevalente y, en el caso de tres valores diferentes, se eligió el valor intermedio. Si el caso únicamente tenía dos cilindros valorables y las puntuaciones eran diferentes, se revisaron de nuevo los TMA y se llegó a una puntuación única consensuada. Conroy y col también emplearon TMA en su trabajo y describen que la puntuación final para los marcadores con heterogeneidad de tinción la obtuvieron de calcular “el valor promedio” de todos los cilindros del caso (Conroy 2014). Creemos que el valor promedio de un sistema de puntuación semicuantitativo como el que utilizan estos autores y el que se ha utilizado aquí resulta un tanto difícil de obtener.

Así pues, con la metodología de *consensus clustering* descrita por Motomura y col y modificada en los puntos que se mencionan arriba, y utilizando como marcadores p53, PTEN, CD44, Olig2, p16, D2-40, PDGFRA, VIM, PGFA, *EGFRa*, *EGFRvIII* y *PDGFRAa*, hemos descrito la existencia de tres subgrupos (A, B y C) en nuestra serie de GB. En 9 de los 64 casos la información molecular era insuficiente por lo que estos casos se consideraron como no valorables para el modelo de *consensus clustering*. Los subgrupos A, B y C, presentaban similitudes con los subtipos PRN, CLS y MES de Verhaak, respectivamente. Estas similitudes se definieron de igual modo a como lo hicieron Motomura y col en su trabajo, es decir, con la observación de niveles altos de marcadores de subtipo PRN en el subgrupo A, de subtipo CLS en el B y de subtipo MES en el C (Motomura 2012) (Figura 30).

**Table 1. Frequency of positive score  $\geq 3$**

Proteins	DOC type (n = 9) (%)	OPC type (n = 17) (%)	Mixed type (n = 14) (%)	AsMes type (n = 39) (%)	Total
<b>Proneural</b>					
Olig2	9 (100)	14 (82)	4 (29)	16 (41)	43
IDH1-R132H	0 (0)	5 (29)	0 (0)	1 (3)	6
p53	1 (11)	9 (53)	9 (64)	5 (13)	24
PDGFRA	3 (33)	10 (59)	5 (36)	3 (8)	21
PDGFB	2 (22)	1 (6)	5 (35)	9 (23)	17
<b>Neural</b>					
Synaptophysin	0 (0)	3 (18)	3 (21)	0 (0)	6
<b>Classical</b>					
p16	0 (0)	9 (53)	11 (79)	2 (5)	22
EGFR	0 (0)	0 (0)	5 (36)	5 (13)	10
Hes-1	0 (0)	3 (17)	9 (64)	11 (28)	23
Nestin	2 (22)	2 (12)	4 (29)	24 (62)	32
<b>Mesenchymal</b>					
VEGF	1 (11)	6 (35)	4 (29)	11 (28)	22
YKL-40	0 (0)	1 (6)	0 (0)	2 (5)	3
Podoplanin	0 (0)	0 (0)	4 (29)	18 (46)	22
CD44	5 (56)	1 (6)	11 (79)	37 (95)	54
GFAP	0 (0)	3 (18)	10 (71)	32 (82)	45
Ki-67	5 (56)	11 (65)	5 (29)	18 (46)	39

AsMes, astrocytic mesenchymal; DOC, differentiated oligodendrocyte; OPC, oligodendrocyte precursor.

**Figura 30:** Tabla de resultados obtenida de la publicación de Motomura y col, donde se muestra la expresión de los diferentes marcadores en sus cuatro subgrupos de GB. Los resultados se expresan como número de casos positivos (con más del 50% de células inmunopositivas) sobre el total de los casos para cada subgrupo. Los autores defienden que hay una prevalencia de marcadores de subtipo PRN en su subgrupo OPC (cuadro naranja), de subtipo CLS en su subgrupo Mixed (cuadro azul) y de subtipo MES en su subgrupo AsMes (cuadro verde), y concluyen que sus subgrupos son similares a los subtipos transcriptómicos de Verhaak y col (adaptado de Motomura 2012)

Para entender nuestra tabla de resultados y la tabla de resultados de Motomura y col que se muestra arriba debe tenerse en cuenta que cuando se elaboraron los dos modelos de *consensus clustering* se consideraron las puntuaciones obtenidas para cada marcador molecular en la escala de 0-1 a 3-5 (donde procediera). Después, cuando se analizó la frecuencia de la expresión de cada marcador en cada uno de los subgrupos de GB que se establecieron por *consensus clustering* (como se muestra en la Figura 30, y en la Tabla 16 del apartado de resultados), se consideraron esos mismos marcadores como variables dicotómicas.

Si se define la validez del modelo por la relación entre subgrupos y marcadores considerados de manera dicotómica debe contemplarse que esta relación estará influenciada por los puntos de corte que se hayan definido para cada uno de los marcadores moleculares. En este punto nuestro trabajo también presenta algunas diferencias con el de Motomura y col.

Para p53 el criterio IHQ que mejor se relaciona con las *TP53m* es la positividad nuclear e intensa en el 10% o más de las células tumorales (Takami 2015, Gillet 2014) y por ello se eligió este punto de corte. En el caso de PTEN se consideraron como casos con pérdida de la expresión aquellos en los que la intensidad de la tinción en las células neoplásicas fue inferior de la observada en los endotelios. La adopción de este criterio de negatividad obedece, en primer lugar, a una mejor reproducibilidad de los resultados entre observadores cuando se comparan con criterios basados en porcentaje o en intensidad sin tener en cuenta la tinción de los endotelios. Además, este criterio de pérdida de expresión es el criterio que han adoptado algunos de los estudios más relevantes en GB, como los que relacionan la expresión IHQ de PTEN con la respuesta a tratamientos con inhibidores de las tirosininasas (Mellinghoff 2005). Definimos como casos inmunonegativos para p16 los casos con menos del 5% de células positivas, ya que existe una relación entre la tinción IHQ para p16 definida de este modo y la delección de *CDKN2A* (Purkait 2013). Como ya se ha comentado en otras partes de este trabajo, se debe recordar que para PTEN y para p16 el evento molecular a detectar sería la pérdida de la expresión y no la positividad IHQ. En el caso de PDGFRA utilizamos una escala de intensidad de 1 a 3 porque la práctica totalidad de los casos mostraba algún tipo de tinción. Consideramos la tinción en el fragmento de parénquima cerebral normal como la negatividad y catalogamos como positivos los casos que presentaban una tinción de intensidad superior. Con respecto a este punto, Conroy y col también catalogan sus casos de una manera similar y discriminan entre GB con tinción “basal” y casos con marcada tinción, porque, en sus manos, ningún caso fue negativo para PDGFRA (Conroy 2014). Para el resto de marcadores IHQ, el punto de corte se situó en el 50% de células tumorales positivas, de manera análoga a lo que se describe en el trabajo de Motomura y col (Motomura 2012).

En cuanto a los marcadores no IHQ, se empleó la definición de *EGFRa* para todos aquellos casos que mostraron una proporción EGFR/CEP7 >2 o innumerables señales de copias en más del 10% de las células tumorales, tal y como emplean la mayoría de los trabajos en la literatura (Rodríguez 2008, Purkait 2016, Horbinski 2011, Korshunov 2004). Para la *PDGFRAa* la situación fue diferente. En nuestro estudio utilizamos una sonda de fabricación propia, sin sonda control centromérica, por lo que se decidió adoptar la definición de casos con *PDGFRAa* únicamente para aquellos tumores que mostraron >40% de las células

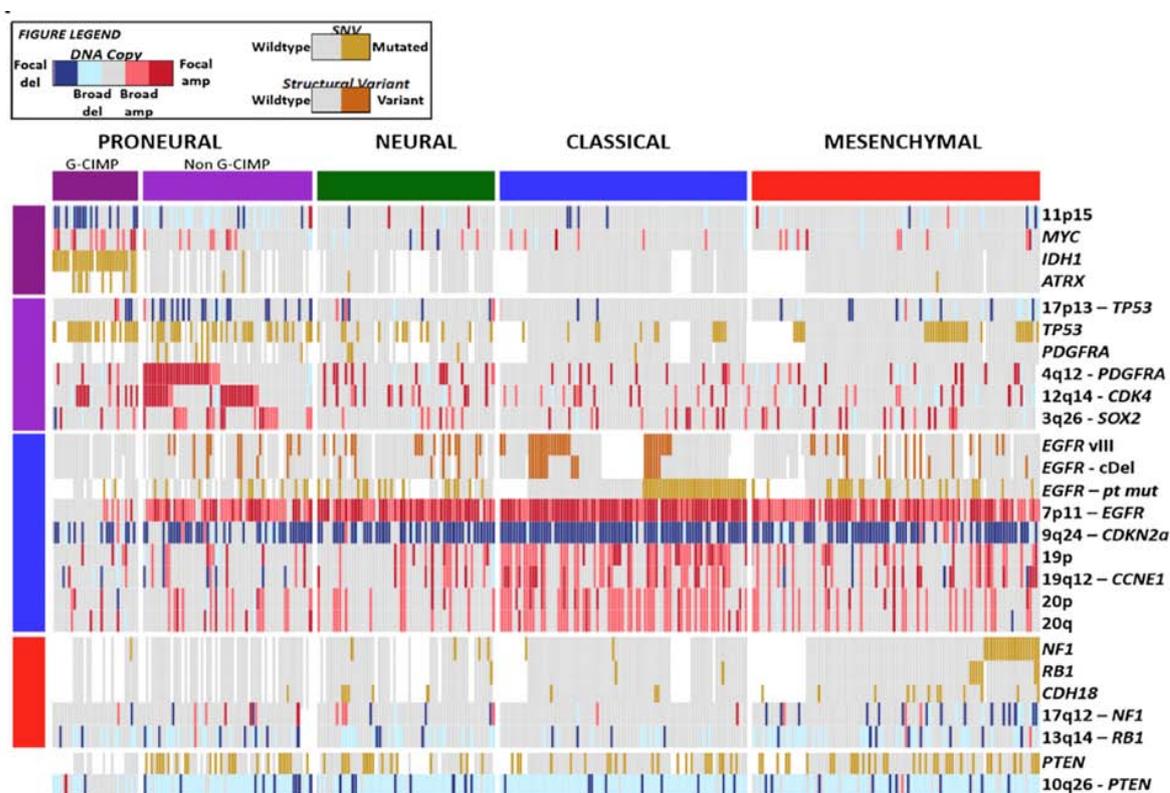
tumorales con 6-12 copias del gen o cuando alguna célula neoplásica tenía  $\geq 12$  copias del gen en alguno de los cilindros del caso, de manera análoga a lo que se ha descrito en la literatura para situaciones similares (sin control centromérico) (Phillips 2013).

Que los subgrupos A, B y C y los descritos por Motomura y col muestren similitud con los subtipos de Verhaak es un resultado esperable, pues los marcadores que se han utilizado para construir ambos modelos de *consensus clustering* son marcadores de expresión diferencial en los subtipos transcriptómicos de Verhaak. En realidad, lo que indicarían estos resultados es que el panel de marcadores que se ha elegido, como panel, es válido para dividir la muestra en subgrupos que remedan los subtipos de PEG. Evidentemente, y como también es esperable en un modelo de *consensus clustering* con pocos casos (55, tras excluir los casos con insuficiente información molecular) y con un número limitado de marcadores, la correlación entre marcadores y subgrupos dista de ser perfecta. Por ejemplo, en el presente trabajo llama la atención que entre los GB subgrupo C hasta el 19% tenían *PDGFRAa* y hasta el 32% tenían *EGFRvIII*, alteraciones descritas de manera más específica entre los GB subtipo PRN y CLS, respectivamente. Estas incoherencias en la distribución de las alteraciones moleculares también se observaban en el estudio de Motomura y col, en el que, por ejemplo, había un caso positivo para IDH1-R132H en su subgrupo *AsMes* (el MES), cuando hoy sabemos que los GB-IDHm son GB-PRN. Asimismo, en dicho estudio el subgrupo con mayores niveles de p53 fue el subgrupo *Mixed* (el supuesto CLS) que, según la literatura, presentaría los menores niveles de *TP53m* (Verhaak 2010, Brennan 2013).

Por tanto, el esquema de clasificación por *consensus clustering* que hemos descrito en este trabajo, así como también los descritos por Motomura y col o Conroy y col, son capaces de distinguir subgrupos de GB que remedan los subtipos transcriptómicos. No obstante, estos modelos no parecen constituir una herramienta suficientemente precisa ni de utilidad práctica para clasificar los casos de GB en el contexto clínico diario. De hecho, cuando los modelos de *clustering* son del tipo no supervisado (como sería el caso de todos los anteriores) no tienen por qué derivar en una clasificación con relevancia clínica (Motomura 2012). En esta línea, y a diferencia de lo que se observa en la serie de Motomura y col, nuestros subgrupos A, B y C no mostraron diferencias significativas en términos de supervivencia global (SG).

Por ello se decidió utilizar otro tipo de aproximación para clasificar los 64 casos de GB con los resultados obtenidos para las diferentes variables moleculares. Este segundo modelo de clasificación tipo “árbol de decisión” se basó en los datos publicados por Brennan y col (Brennan 2013). En este trabajo los autores utilizan plataformas de análisis genómico y epigenómico a gran escala y describen todas las alteraciones moleculares y su frecuencia

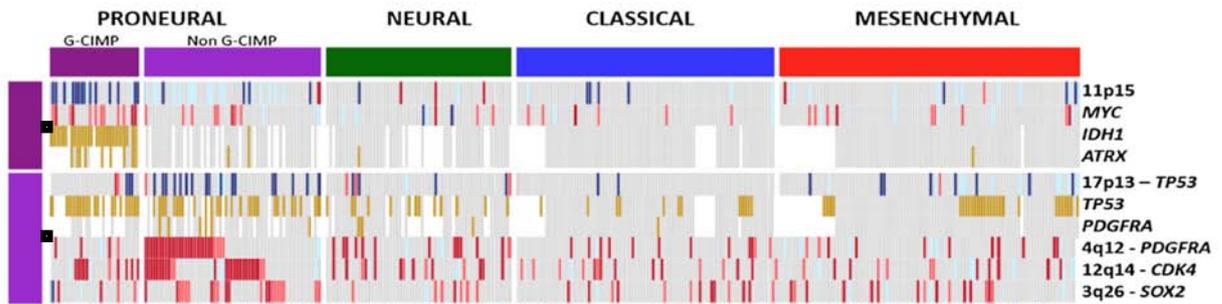
exacta en una serie de más de 500 casos de GB. En una parte de este exhaustivo estudio, Brennan y col clasifican sus casos en subtipos transcriptómicos y describen la frecuencia de algunas de las alteraciones genómicas en cada uno de los subtipos de GB. De hecho, la mitad de sus casos se corresponden con los casos analizados por Verhaak y col (Verhaak 2010), pues ambos trabajos se han realizado bajo el amparo del TCGA. El artículo que publicaron no detalla en exceso los resultados de esta parte del estudio y no se especifica, por ejemplo, el número preciso de casos de GB que se analizaron de este modo (que parece constituir un número variable para cada tipo de alteración molecular) o cuál fue la frecuencia exacta de cada una de las alteraciones moleculares en cada uno de los subtipos de GB. Sin embargo, el artículo incluye una figura muy representativa, de donde pudimos obtener información interesante tal y como se detalla a continuación (Figura 31).



**Figura 31:** Subtipos transcriptómicos de GB y su correlato genómico (Brennan 2013) (Los espacios en gris corresponden a la ausencia de alteración y los espacios en blanco a los casos en que no se pudo realizar la determinación)

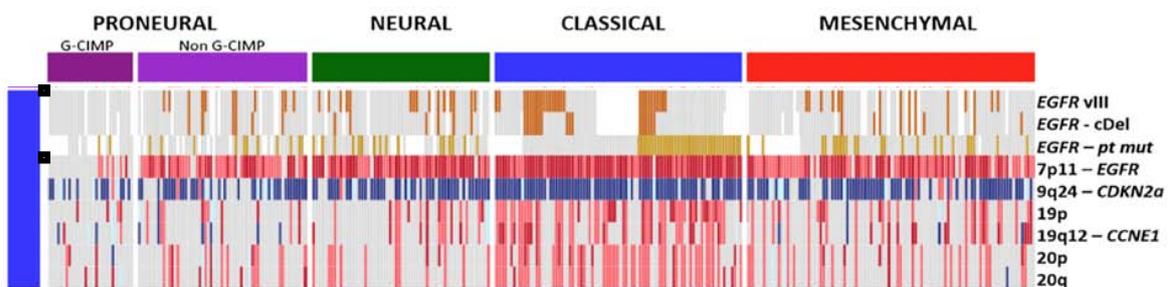
En la Figura 31 se constata que las *IDHm* (al menos de *IDH1*) se observan de manera exclusiva en los GB del subtipo PRN, y dentro de éstos en el grupo de GB G-CIMP. El grupo de GB G-CIMP se correlaciona de manera prácticamente completa con los GB-IDHm y sólo algún caso puntual de GB G-CIMP no muestra *IDHm* (Figura 32). Luego se podría asumir que un GB-IDHm, como el que se observó en nuestra serie, es un caso de GB subtipo PRN G-CIMP. El siguiente detalle que se puede observar en esta figura es que la mayoría de los

GB con *PDGFRAa* se concentran en el subtipo PRN no G-CIMP, aunque parece ocurrir en menos del 50% de los casos. Con ello se podría simplificar que los casos con *PDGFRAa* serían probablemente GB de subtipo PRN no G-CIMP (Figura 32).



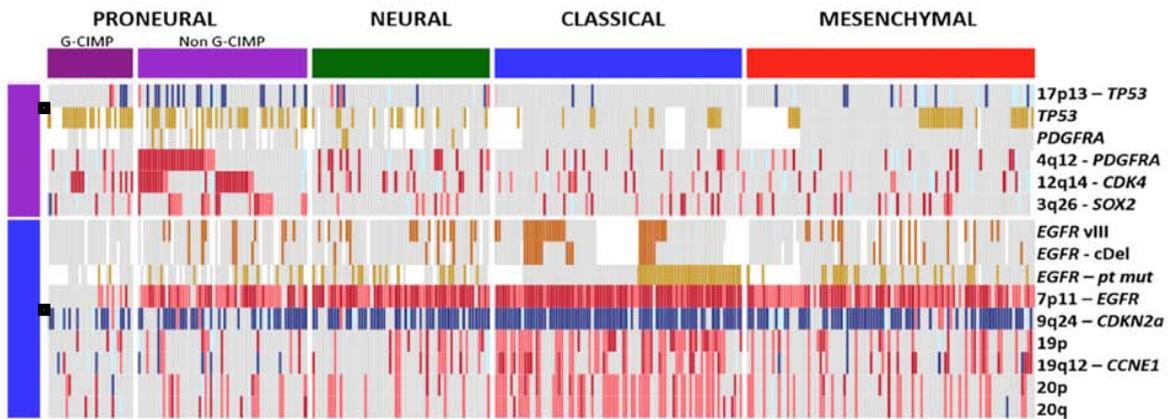
**Figura 32:** Subtipos transcriptómicos de GB y su correlato genómico (adaptado de Brennan 2013). Se han resaltado los apartados que hacen referencia a la *IDH1m* y a la *PDGFRAa*

Parece existir una mayor frecuencia de casos con *EGFRvIII* entre los GB de subtipo CLS, aunque esta alteración no sería muy sensible ni completamente específica. Así que, en una aproximación simplista, se podría considerar que un GB con *EGFRvIII* posiblemente es del subtipo CLS (Figura 33). Un detalle curioso es que, aunque más prevalente entre los casos de subtipo CLS, la *EGFRa* se observa en prácticamente todos los casos de GB, excepto en algunos GB G-CIMP. Por tanto, la *EGFRa* no parece constituir un marcador específico de subtipo CLS, aunque sí muy sensible: un caso sin *EGFRa* probablemente no es un GB subtipo CLS (Figura 33).



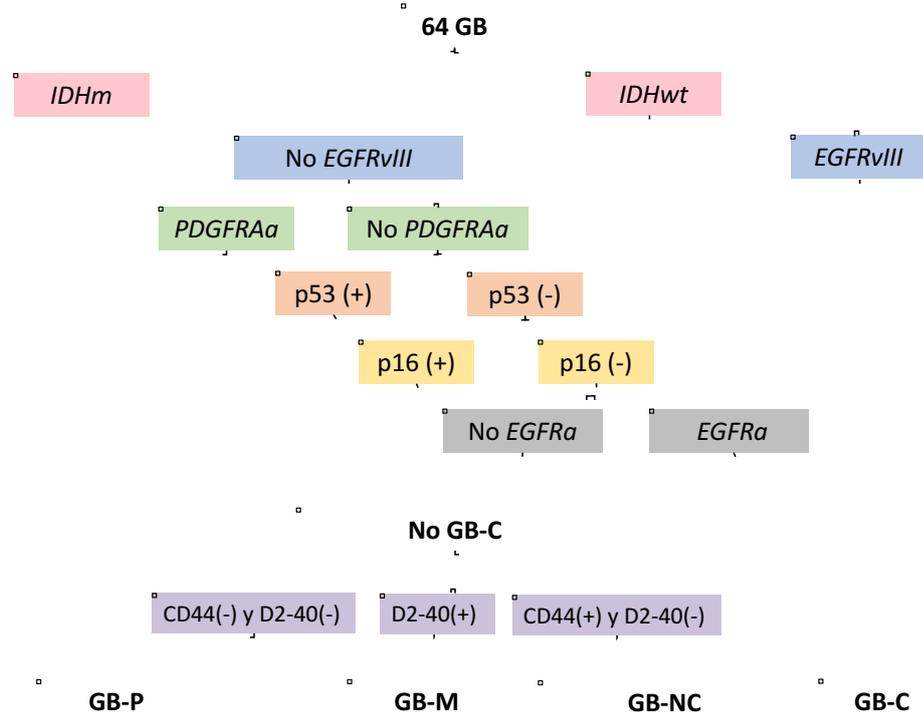
**Figura 33:** Subtipos transcriptómicos de GB y su correlato genómico (adaptado de Brennan 2013). Se han resaltado los apartados que hacen referencia a la *EGFRvIII* y a la *EGFRa*

A partir de aquí somos conscientes de que las aproximaciones que haremos son todavía más imprecisas. La *TP53m* parece ser más frecuente entre los GB de subtipo PRN o MES que entre los CLS. Aunque se observa delección de *CDKN2A* en todos los subtipos de GB, la gran mayoría de tumores subtipo CLS tienen esta alteración (Figura 34). Por último, señalar que las alteraciones de *PTEN* se observan prácticamente por igual en todos los subtipos moleculares (Figura 31).



**Figura 34:** Subtipos transcriptómicos de GB y su correlato genómico (adaptado de Brennan 2013). Se han resaltado los apartados que hacen referencia a la TP53m y a la delección de CDKN2A (p16)

Así, en base a la lectura de esta figura del trabajo de Brennan y col del modo anteriormente expuesto, se elaboró un algoritmo de clasificación con los resultados del análisis de *IDHm*, *PDGFRAa*, *EGFRvIII*, *EGFRa*, p53 y p16, a los que se añadieron D2-40 y CD44 como marcadores de subtipo MES. Para hacer la discusión más comprensible se vuelve a insertar aquí la figura que se mostró en el apartado de resultados con el esquema de nuestro “árbol de decisión” (Figura 35).



**Figura 35:** Algoritmo de decisión utilizado para clasificar los casos de GB en subgrupos moleculares basado en el análisis de los resultados publicados por Brennan y col (Brennan 2013) (En la figura se ha denominado “No GB-C” al grupo provisional de “GB no clásico”)

Como muestra la Figura 35, con este segundo algoritmo los tumores se clasificaron en cuatro subgrupos, que se denominaron “GB tipo proneural” (GB-P), “GB tipo clásico” (GB-C), “GB tipo mesenquimal” (GB-M) y “GB no clasificables” (GB-NC).

Las frecuencias de estos subgrupos son similares a las publicadas en la literatura para los diferentes subtipos transcriptómicos de GB si se tienen en cuenta algunas consideraciones. Los GB subtipo PRN representan entre el 26 y el 31% de los GB (Brennan 2013, Lee 2008, Phillips 2006, Verhaak 2010). Algunos de los estudios referenciados incluyen GI de grado III y sGB, tumores que frecuentemente muestran *IDHm* y que, por tanto, alimentan el grupo de tumores subtipo PRN G-CIMP. Si limitamos el análisis de los datos a las series que detallan la frecuencia de GB subtipo PRN no G-CIMP (GB-IDHwt) (como prácticamente sería la nuestra, con un único caso de GB-IDHm), la frecuencia del subtipo PRN se situaría en torno al 20%, similar al 18,8% de nuestro subgrupo GB-P (Brennan 2013). Para el resto de subtipos, los diferentes trabajos describen frecuencias del 26-31% para el GB subtipo CLS, similar al 26,6% de nuestro subgrupo GB-C, y entorno al 28-40% para el subtipo MES, similar, también, al 32,8% de nuestro subgrupo GB-M (Brennan 2013, Lee 2008, Phillips 2006, Verhaak 2010).

Con el algoritmo que se ha mostrado pudimos clasificar el 82% de los casos de GB. Estas cifras son superiores a las que han obtenido otros autores, como Conroy y col que, siguiendo el esquema que se ha mostrado en el apartado de introducción, únicamente consiguieron clasificar el 62% de sus casos (Conroy 2014). En el trabajo de Le Mercier y col, sólo un 2% de los tumores quedaron sin clasificar. Esta cifra tan baja se explica por la baja frecuencia de GB con ausencia de *EGFRa* y de expresión de p53 o PDGFRA, el criterio que utilizaron estos autores para definir sus casos “no clasificables” (Le Mercier 2012). En la presente serie, únicamente 4 casos (6%) fueron negativos para PDGFRA y p53 y no tenían *EGFRa*. La metodología aplicada por Motomura y col no permite identificar casos no clasificables, como tampoco quedó por clasificar ninguno de los casos de este trabajo cuando se aplicó el modelo de *consensus clustering*.

Se consideran como casos no clasificables (GB-NC) aquellos que, aun disponiendo de toda la información molecular necesaria, no pueden asignarse a un subgrupo concreto. A diferencia de los GB-NC, los casos no valorables serían aquellos en los que la información molecular está incompleta. Un ejemplo de caso no valorable sería un caso donde no se pueda valorar la expresión de p53, por ejemplo, por falta de tejido tumoral viable residual en el TMA, después de las múltiples secciones realizadas para valorar otros marcadores. Definidos de este modo, se obtuvieron 9 casos no valorables para el modelo de *consensus*

*clustering*, tal y como hemos mencionado anteriormente, y sólo 4 casos no valorables para el modelo tipo “árbol de decisión”. Esta diferencia se debe a dos hechos. Para empezar en el modelo de *consensus clustering* se utilizó la información obtenida a partir de 12 marcadores, mientras que para el segundo modelo sólo se consideraron 8 marcadores. Además, en el modelo tipo “árbol de decisión”, si un caso tenía, por ejemplo, *PDGFRA* se catalogó como GB-P independientemente de si no existía información sobre el resto de marcadores que aparecen más tardíamente en el esquema de clasificación.

Si únicamente se consideran los casos clasificables, las frecuencias de los diferentes subgrupos se situarían en torno al 24% para el subgrupo GB-P, 35% para el subtipo GB-C y 41% para el GB-M. Sin embargo, creemos que los datos no deben analizarse de este modo, puesto que la práctica totalidad de los estudios de PEG describen la existencia de un cuarto subtipo de GB, el subtipo NEU, que, por los motivos que ya se han mencionado, no se ha contemplado en este trabajo. El GB subtipo NEU representaría, aproximadamente, el 16-18% de los casos de GB, frecuencia similar al 18% de nuestros casos de GB-NC (Brennan 2013, Verhaak 2010). En este aspecto, Purkait y col utilizan una estrategia similar a la que aquí proponemos para valorar la frecuencia de sus subgrupos. Los autores catalogan como casos tipo NEU a aquellos que no cumplen los criterios que definen para sus subgrupos tipo PRN, tipo CLS y tipo MES (Purkait 2016). Este subgrupo es el que denominamos GB-NC en el presente trabajo.

Al analizar las diferentes alteraciones moleculares en cada uno de estos subgrupos se observó que, al igual que se había descrito para los subgrupos del *consensus clustering*, existía una relación entre marcadores de subtipo PRN y GB-P, de subtipo CLS y GB-C, y de subtipo MES y GB-M. Esta relación se encuentra claramente contaminada por el propio diseño del “árbol de decisión”, pues el resultado de algunos de esos marcadores constituye el criterio utilizado para asignar un caso a un determinado subgrupo. Dicho de otro modo, únicamente se debería hacer el análisis de la relación entre los marcadores moleculares y los subgrupos de GB generados por este modelo para aquellos marcadores que, o bien aparecen muy tardíamente en el algoritmo de clasificación, o, mejor todavía, no forman parte de él, como *PGFA*, *VIM*, *PTEN*, *Olig2* o *PDGFRA*.

Con respecto a *PGFA* y *VIM*, se constató que los tumores del subgrupo GB-M (los MES) mostraban los niveles más altos de expresión y los GB-P (los PRN) los más bajos. Para el caso de *PGFA*, Motomura y col describen unos resultados similares (Motomura 2012). Con respecto a *VIM*, Phillips y col observan niveles elevados de expresión génica en sus GB subtipo MES (Phillips 2006). Creemos que la valoración de la expresión de *PGFA* y *VIM*

son, al menos en parte, dependientes de la morfología del GB. Nuestra impresión es que los casos con una fibrillaridad más fina resultarían menos evidentes con estas tinciones y por tanto mostrarían las puntuaciones más bajas en términos de porcentaje de positividad. A favor de esta hipótesis, el subgrupo de GB-P presentó el mayor número de casos con este patrón histológico (PH) de procesos citoplasmáticos finos y delicados al que definimos como PH-A (ver más adelante).

La pérdida de la expresión de PTEN afectaba de manera predominante a los GB-C (los CLS). Este resultado concuerda con las observaciones de Verhaak y col, que describen una cifra elevada de delección y mutación de *PTEN* en este subtipo de GB (Verhaak 2010). No obstante, el mismo TCGA, cuando amplía la serie de GB estudiados, y según hemos mostrado antes en la figura del trabajo de Brennan y col, no parece encontrar grandes diferencias en términos de alteraciones de *PTEN* entre los diferentes subtipos de GB (Brennan 2013).

Aunque la expresión IHQ de Olig2 y PDGFRA han sido relacionadas en algunos trabajos con los GB subtipo PRN (Conroy 2014, Motomura 2012, Popova 2014), en la presente serie no se ha observado una relación entre estos marcadores y el subgrupo GB-P. Con respecto a Olig2, la evidencia de su relación con los GB PRN se fundamenta en varias observaciones. *Olig2* constituye uno de los genes con expresión diferencial en los subtipos de PEG descritos por Verhaak y col y en los subtipos de Phillips y col. En ambos trabajos, este gen se encuentra sobreexpresado en los GB PRN (Phillips 2006, Verhaak 2010). Además, en el estudio de Phillips y col los casos de GB que en la recurrencia cambiaron su perfil de subtipo PRN a subtipo MES perdían la expresión IHQ de Olig2 (Phillips 2006). Olig2 ha sido descrito como un marcador de células progenitoras situadas en la región subventricular del cerebro (Ligon 2004), la región donde, según algunos autores, se localizarían preferentemente los GB PRN (Steed 2016). La tinción IHQ para Olig2 se ha constituido, en los últimos años, como un marcador de utilidad diagnóstica en gliomas (Louis 2016). Los artículos que revisan la expresión de Olig2 en los diferentes tipos de gliomas infiltrantes (GI) coinciden en que son los OD los tumores que muestran un mayor número de células inmunopositivas, mientras que la positividad en el GB sería más variable. No obstante, prácticamente el 100% de los casos de GB mostrarían tinción para Olig2 con el 50-70% de células tumorales positivas como media (Ligon 2004). Por tanto, es posible que un punto de corte situado en el 50% no sea el más adecuado para discriminar subgrupos de GB con expresión diferencial de Olig2. Si nos referimos a PDGFRA, su relación con el GB PRN se basa en la inferencia de que existen niveles elevados de *PDGFRAa* en este subtipo de tumores. Son varios los estudios en la literatura que señalan

que no existiría correlación entre la expresión proteica de PDGFRA y la *PDGFRAa* (Martinho 2009, Papova 2014). En nuestra experiencia, y aunque la relación entre expresión proteica de PDGFRA y *PDGFRAa* no resultó estadísticamente significativa, observamos que únicamente uno de los 22 casos inmunonegativos para PDGFRA tenía *PDGFRAa*. No obstante, estos resultados deben interpretarse con cautela puesto que sólo en 9 de los 58 casos evaluables observamos *PDGFRAa*. Además, en nuestra experiencia, la valoración de la inmunotinción para PDGFRA resulta un tanto subjetiva pues, como ya se ha comentado, no existían casos claramente negativos y la mayoría de ellos caían en el grupo de intensidad leve o moderada, grupos difíciles de delimitar con exactitud.

Phillips y col describieron diferencias en el índice de proliferación celular (Ki67) entre sus tres subtipos moleculares, con niveles de aproximadamente el 10% para el subtipo PRN, el 32% para el PROL y el 18% para el MES (Phillips 2006). No tenemos referencias en la literatura sobre los niveles de Ki67 en los subtipos transcriptómicos de Verhaak, pero en el presente trabajo, y aunque el subgrupo de GB-P mostró los niveles más elevados (22% frente a 16% para los GB-C y los GB-M), esta diferencia no resultó significativa.

La *pMGMTmet* constituye un reconocido marcador con valor pronóstico en GB. Dado que uno de los objetivos de este trabajo era comparar las curvas de supervivencia de los diferentes subgrupos de tumores, se estudió la *pMGMTmet* en todos los casos de nuestra serie. Cuando se analizaron estos datos por subgrupos, los GB-P mostraron los niveles más elevados de *pMGMTmet*. Según la literatura, no parece existir diferencias en términos de *pMGMTmet* entre los tres subtipos de GB, PRN, CLS y MES (Verhaak 2010). Los GB PRN G-CIMP sí que muestran una mayor tasa de *pMGMTmet*, como uno más de los múltiples genes que se metilan en este subtipo de tumores (Wick 2013). Se ha descrito que el único grupo de tumores en el que la *pMGMTmet* constituiría un factor predictivo de respuesta al tratamiento (con el esquema de Stupp) sería el subtipo GB CLS (Brennan 2013). La presente serie de casos es muy pequeña y los pacientes no han sido tratados de una manera uniforme ni han recibido todos TMZ. Por ello no hemos podido corroborar estos resultados.

A diferencia de los subgrupos obtenidos con el análisis de *consensus clustering*, los tres subgrupos moleculares GB-P, GB-C y GB-M sí mostraron diferencias con significación estadística en términos de SG. Los pacientes con una mayor SG eran los que presentaban GB-C, seguidos de GB-P y después de GB-M, los cuales tuvieron SG prácticamente superponibles. Además, la pertenencia al subgrupo GB-C mantenía su poder como factor de buen pronóstico independiente en el análisis multivariante, donde se contemplaron las

variables tipo de cirugía, KPS y edad. Las primeras publicaciones en la literatura describían que eran los GB PRN los que mostraban las SG más largas, en tanto que los GB MES constituían el subtipo de peor pronóstico. En estos análisis no se contemplaba la diferenciación entre GB PRN G-CIMP y no G-CIMP (Phillips 2006, Verhaak 2010). Los estudios más recientes, que sí que hacen esta distinción, apuntan que los GB CLS constituirían el subtipo de tumores con mayor SG y que los GB PRN no G-CIMP mostrarían SG similares a las del subtipo MES, de manera similar a lo que hemos observado en el presente estudio (Brennan 2013). Nuestro único paciente con un GB-IDHm mostró una SG de 24 meses, superior a la mediana que se observó en toda la serie (13 meses) y a la SG mediana del subgrupo de GB CLS, los de mayor SG (16,7 meses). Repetimos los estudios de supervivencia sin tener en cuenta a este paciente y obtuvimos unos resultados similares, con un nivel de significación aún mayor, tal y como cabía esperar.

Por tanto, y en base a la similitud en términos de frecuencia y de SG entre los subgrupos aquí descritos y los publicados en la literatura para los diferentes subtipos de PEG, creemos que un algoritmo de clasificación basado en el estudio secuencial de *IDH*, *EGFRvIII*, *PDGFRAa*, p53, p16, *EGFRa*, D2-40 y CD44 podría constituir una herramienta de aproximación a la clasificación transcriptómica del GB. Pensamos que esta herramienta sería, además, implementable en la mayor parte de los servicios de patología. Para ello, la metodología empleada debería ser aquella con la que los patólogos tengamos experiencia y equipamientos, y para la que la interpretación de los resultados resulte reproducible.

Creemos que el estudio de *IDH* debe hacerse por IHQ (utilizando el anticuerpo IDH1-R132H) seguido de la secuenciación de *IDH* únicamente en los casos inmunonegativos de pacientes menores de 55 años, tal y como recoge la actual clasificación de la OMS (Louis 2016).

Existen anticuerpos que detectan la proteína EGFRvIII. La sensibilidad y especificidad de esta metodología se sitúa en torno al 95% y el 100%, respectivamente (Aldape 2004). Por tanto, es posible que la determinación IHQ de EGFRvIII, más rápida, sencilla y económica, constituya una herramienta útil que podría sustituir la determinación de *EGFRvIII* por RT-PCR en nuestro algoritmo de clasificación. No obstante, en la actualidad los anticuerpos anti-EGFRvIII son difíciles de obtener y únicamente se encuentran disponibles en el contexto de ensayos clínicos (Maire 2014).

Para el análisis de la *EGFRa*, y aunque existirían otras aproximaciones, proponemos el estudio mediante FISH, una metodología de uso habitual en los laboratorios de patología.

Para valorar la relación EGFR/CEP7 sugerimos un punto de corte de EGFR/CEP7  $>2$  en  $>10\%$  de las células tumorales, porque es el criterio que adoptan la mayoría de los trabajos publicados (Horbinski 2011, Korshunov 2004, Purkait 2016, Rodriguez 2008). No obstante, en nuestra experiencia, la mayor parte de los casos muestran más de 50-100 copias del gen en un gran número de células, lo que comporta que la interpretación de la *EGFRa* por FISH en GB sea un resultado fácilmente reproducible. El estudio de la expresión IHQ de EGFR no parece constituir una estrategia útil para determinar la *EGFRa*. Para empezar, no existen criterios estandarizados sobre cómo evaluar la positividad IHQ para EGFR. Además, la inmunotinción para EGFR no constituye un marcador específico de la *EGFRa*, pudiendo resultar positiva en tumores de menor grado, sin *EGFRa* (Horbinski 2011). Es por ello que algunos autores recomiendan que, sobre todo en el contexto de ensayos clínicos o para la toma de decisiones terapéuticas, se investigue directamente la amplificación del gen con las metodologías más adecuadas, como, por ejemplo, la FISH (Tanboon 2015).

En lo que respecta a la *PDGFRAa* también defendemos el estudio mediante FISH. En el presente trabajo, y ante la ausencia de una sonda centromérica a modo de control, se han considerado como positivos para *PDGFRAa* aquellos casos con  $>40\%$  de las células tumorales con 6-12 copias del gen o los casos en los que alguna célula neoplásica tenía  $\geq 12$  copias del gen (Phillips 2013). En realidad, y al igual que hemos descrito para la *EGFRa*, los 9 casos de nuestra serie con *PDGFRAa* tenían células con múltiples copias del gen (muchas más de 12). Podríamos explorar si la adopción de la definición de caso con *PDGFRAa* como aquel que muestre una proporción de PDGFRA/CEP4  $>2$ , de manera análoga a lo que emplean otros autores (Purkait 2016, Rodriguez 2008), supondría una mejora en nuestro modelo de clasificación. No obstante, se ha descrito la existencia de un gran número de casos de GB que muestran coamplificación del centrómero del cromosoma 4, lo que supondría una limitación para la interpretación de los resultados de la *PDGFRAa* basados en la relación PDGFRA/CEP4 (Phillips 2013). Como ya se ha mencionado anteriormente, el análisis de la expresión proteica de PDGFRA no parece constituir una opción viable (Martinho 2009, Papova 2014).

Para p53, la gran mayoría de los trabajos definen la inmunopositividad para p53 como una positividad “difusa e intensa” (Camelo-Piragua 2011, Tanboon 2016) o una inmunotinción nuclear intensa en más del 50% de las células tumorales (Neumann 2016, Rodriguez 2008). No obstante, y aunque la correlación entre IHQ y *TP53m* dista de ser perfecta, parece existir una buena asociación entre inmunopositividad para p53 y *TP53m* siempre que el punto de corte de la inmunotinción se sitúe en el 10% de células tumorales positivas y únicamente se valore una intensidad de tinción marcada (Takami 2015, Gillet 2014). Por tanto, y como

el evento molecular a detectar serían la *TP53m*, creemos que éste sería el mejor punto de corte. La tinción IHQ de p53 es una tinción nuclear (de fácil interpretación en los GI) y el anticuerpo que emplean la mayoría de estudios corresponde siempre a la misma clona (D-07). Esta es también la misma clona que se utiliza en la mayor parte de los laboratorios de patología para la rutina diagnóstica diaria y con la que los patólogos tenemos años de experiencia.

Existe una asociación significativa entre la delección de *CDKN2A* (especialmente cuando es una delección homocigota, como la que se produce en el GB) y la inmunonegatividad para p16, definida como ausencia de positividad u ocasionales células tumorales positivas (Purkait 2013). La proteína p16 constituye también un antígeno con expresión nuclear (en realidad nuclear y citoplasmática) de fácil interpretación. Además, la inmunotinción para p16 se utiliza en la práctica clínica diaria, principalmente en el contexto de las neoplasias de cérvix u orofaringe, en relación a la infección por el virus de papiloma humano, por lo que la técnica está estandarizada y los patólogos tenemos experiencia en su interpretación. En nuestra experiencia los GB tienen o muchas (más del 75%) o muy pocas células inmunopositivas (menos del 5%) para p16, lo que resulta en una catalogación del caso con una elevada concordancia entre observadores. Nuestro grupo ha tenido la oportunidad de revisar la inmunotinción para p16 en una serie de 276 casos de GB que catalogamos como positivos o negativos y la concordancia entre dos observadores alcanzó el 100%. Por tanto, creemos que la sustitución de las inmunotinciones de p53 y p16 por el análisis de *TP53m* y de la delección de *CDKN2A*, técnicas más laboriosas y con mayor requerimiento de tiempo y tejido, no constituiría una buena opción en nuestro modelo de clasificación, que pretende constituirse en una herramienta de fácil y amplia implementación en los servicios de patología.

Somos conscientes de la necesidad de encontrar mejores marcadores que permitan diferenciar el subtipo de GB MES. Algunos GB MES muestran mutaciones en *NF1*, las cuales parecen estar limitadas a este subtipo de GB (Brennan 2013, Verhaak 2010). Así, el estudio del gen *NF1* permitiría detectar de manera específica, aunque poco sensible, este subtipo de GB. La secuenciación del gen *NF-1* no parece una opción viable, pues existen diferentes *hotspots* de mutación. Una aproximación más práctica sería el estudio del ARNm mediante RT-PCR tal y como lo abordan Purkait y col en su serie de GB (Purkait 2016) o, mejor aún, la tinción IHQ para neurofibromina, la proteína que codifica el gen *NF1*, tal y como se describe en el trabajo de Conroy y col (Conroy 2014). YKL40, CD44, D2-40, STAT3, MET o VEGFR constituirían, también, ejemplos de los múltiples marcadores IHQ que se han relacionado con los GB subtipo MES (Conroy 2014, Motomura 2012, Phillips

2006, Popova 2014). De entre todos estos marcadores escogimos D2-40 y CD44 para identificar el subtipo MES porque son de uso habitual en los laboratorios de patología y porque, en manos de Motomura y col, constituyen los mejores marcadores de su subgrupo *AsMes* (el equivalente al subtipo MES) (Motomura 2012). De entre ellos, CD44 parece mostrar una menor especificidad para el subtipo MES, y prueba de ello es que en la serie de Motomura hasta el 79% de los GB *Mixed* (los CLS) y el 56% de los *DOC* (el cuarto subgrupo de GB) mostraron niveles altos de expresión de CD44. En la presente serie el 84% de todos los casos de GB tenían expresión de CD44, lo que indicaría que CD44 es un marcador muy prevalente en GB, probablemente presente en todos los subtipos de GB. Por ello, para nuestro modelo de clasificación, escogimos D2-40 como marcador más específico del subtipo MES y los casos que mostraron positividad para CD44 en ausencia de inmunotinción para D2-40 fueron catalogados como GB-NC. De forma análoga consideramos que la ausencia de marcadores de serie MES en aquellos GB que habían sido catalogados provisionalmente como “GB no clásico”, podía indicar que se trataban de GB de subtipo PRN. Otra opción hubiera sido considerar estos casos doblemente negativos como GB-NC. A la vista de que únicamente un caso de GB *OPC* (el PRN) en la serie de Motomura presentó positividad para CD44 y ninguno de ellos resultó positivo para D2-40, se decidió que una doble negatividad D2-40/CD44 en un “GB no clásico” era probablemente indicativo de un GB subtipo PRN.

Aunque los pacientes con GB-P tenían una mediana de edad inferior al resto de los subgrupos, esta diferencia no alcanzó niveles de significación estadística. En los estudios más antiguos los pacientes con tumores de perfil PRN eran más jóvenes (Phillips 2006, Verhaak 2010). Las series más actuales no encuentran diferencias de edad ni sexo entre los diferentes subtipos de Verhaak, una vez excluidos los pacientes con GB G-CIMP (Sturm 2012, Brennan 2013). Por ello se analizaron de nuevo los datos sin considerar el único paciente con GB-IDHm, que tenía 34 años de edad, y en este segundo análisis se observó que la edad mediana de los GB-P aún se acercaba más a la del resto de subgrupos. En cuanto a la distribución por lóbulos cerebrales, algunos trabajos muy recientes apuntan al hecho de que los diferentes subtipos de GB se distribuirían de manera diferente en relación con la región subventricular del cerebro, y que los GB PRN serían los más próximos a esta zona. Además, existiría una tendencia a que los tumores PRN ocuparan los lóbulos frontales y temporales y tuvieran un predominio por el lado izquierdo, frente al resto de los subtipos, donde la distribución sería más azarosa (Lai 2011, Steed 2016). Nuestros GB-P ocupaban el lado izquierdo en el 50% de los casos, a diferencia del resto de subtipos, que tenían un claro predominio por el lado derecho. En cuanto a los lóbulos afectados, no observamos ninguna relación evidente entre nuestros subgrupos y la localización tumoral.

Cuando se habla de la localización y la lateralidad de los GB debe tenerse siempre en cuenta el sesgo que puede suponer la obtención del material para estudios moleculares. Como ya se mencionó con anterioridad, cualquier estudio que requiera grandes cantidades de tejido para el análisis molecular representará probablemente una población enriquecida en lesiones de determinadas localizaciones, de fácil acceso quirúrgico, como los lóbulos frontales, y predominantemente situadas en el hemisferio no dominante (en la mayoría de las personas el hemisferio derecho). Con respecto a este hecho nos gustaría comentar que siempre existe un sesgo “quirúrgico” en la población que analizan todos los estudios que utilizan material tisular. Y que ese sesgo, en el caso del GB, no afectaría solamente a las diferentes localizaciones del tumor sino también a otros aspectos como la edad de los pacientes. Llama la atención que los pacientes incluidos en los estudios de Verhaak y col y Phillips y col muestran una mediana de edad de en torno a los 55 años (Phillips 2006, Verhaak 2010,), lo que en nuestra opinión refleja la tendencia que existía hace unos años a no realizar más que una biopsia de la lesión a los pacientes de edad avanzada (Barnholtz-Sloan 2008).

El 14% de nuestros casos eran multifocales siendo esta multifocalidad más manifiesta entre los casos de GB-P. En este trabajo se ha definido la multifocalidad en términos radiológicos. Definida de este modo, la frecuencia de los GB multifocales en la literatura oscila entre el 10% en las series más antiguas (Djalilian 1999) y el 35% en los trabajos más actuales, que utilizan técnicas radiológicas más sofisticadas (Thomas 2013). No existen trabajos en la literatura que hayan explorado la multifocalidad tumoral en los diferentes subtipos de GB.

Aunque en un inicio pensamos que el subgrupo GB-NC estaría muy contaminado por casos de GB-M, dada la ausencia de marcadores específicos para el subtipo MES, como ya mencionamos, los tumores de este subgrupo presentaron características moleculares similares a las observadas tanto en los subgrupos GB-P como en los GB-M, tales como bajos niveles de VIM (los menores de toda la serie) con niveles medios de PTEN y elevada expresión de PGFA. Por otro lado, su mediana de SG fue de 17,2 meses, más cercana a la SG de los GB-C que a la del resto y constituyendo la SG más larga de toda la serie. Creemos, pues, que este subgrupo representa probablemente una mezcla de casos del resto de subgrupos y que del mismo no se puede extraer ningún tipo de conclusiones.

A pesar de que la relación mostró significación estadística, únicamente en el 49% de los casos hubo concordancia entre el subgrupo asignado por el modelo de *consensus clustering* y el asignado por el algoritmo tipo “árbol de decisión”. Estos datos se explicarían, una vez más, por la propia estrategia de clasificación que emplean los modelos de

*consensus clustering*, basada en distancia en el espacio entre individuos definidos por los valores de las múltiples variables empleadas, una estrategia muy diferente a la que emplea un “árbol de decisión.

Por último, y aunque el objetivo de este trabajo ha sido reproducir los subtipos transcriptómicos de GB como herramienta de clasificación con utilidad clínica, somos conscientes de que la propia clasificación del GB mediante PEG presenta limitaciones importantes que hacen difícil la extrapolación de sus resultados en la práctica diaria. Algunas de estas limitaciones serían la naturaleza retrospectiva de los estudios, el hecho de que no todos los pacientes incluidos recibieron el mismo tratamiento, y, sobre todo, el sesgo de incluir únicamente tumores resecables, con disponibilidad de tejido congelado para los análisis (Aldape 2015). Un problema adicional en la clasificación molecular de los GB es la conocida heterogeneidad intratumoral, un hecho que ha sido descrito también en relación a los PEG (Patel 2014). Algunos tumores cambiarían el subtipo transcriptómico tras la cirugía o el tratamiento radioquimioterápico (Bhat 2013, Phillips 2006), e incluso un trabajo publicado recientemente propone que la totalidad de los GB provendrían de un GI precursor de subtipo PRN, por lo que los subtipos transcriptómicos representarían diferentes fases en la evolución de un mismo tumor (Ozawa 2014). En base a todo lo anteriormente expuesto, algunos autores opinan que la asignación de un GB a un determinado subtipo transcriptómico podría representar una simplificación de la realidad, pues los tumores constituirían una mezcla heterogénea de patrones transcriptómicos (Aldape 2015).

### **V.2. Características histopatológicas y moleculares**

#### **V.2.1. Patrones histológicos y su relación con los subgrupos moleculares**

Motomura y col observaron que sus diferentes subgrupos de GB mostraban un patrón histológico (PH) distinto. Por ello se revisaron todas las secciones histológicas de los 64 casos y se asignó un PH a cada uno de nuestros casos. Se definieron tres PH, PH-A, PH-B y PH-C de manera similar a la que se especifica en el trabajo de Motomura y col (Motomura 2012), y se añadió un cuarto patrón (PH-D) para los casos de GBCP. Existía una tendencia a la relación entre los PH y los subgrupos GB-P, GB-C y GB-M, de tal forma que el PH-A (el patrón más PRN en manos de Motomura) era el patrón más frecuente entre los casos de GB-P, mientras que el PH-B (el que Motomura define como propio de sus casos MES) era el patrón más frecuente entre los casos GB-M. No obstante, esta relación

distaba de ser perfecta, pues el PH-B también era el PH más prevalente entre los GB-C y la mayoría de los casos con PH-C (el más CLS) caían en el grupo de los GB-M o incluso de los GB-P, pero no de los GB-C, como sería lo esperable.

Más allá de los PH de Motomura y col, algunos autores han relacionado determinadas variantes de GB descritas por la OMS con los diferentes subtipos transcriptómicos (Verhaak 2010). De este modo, los GBCO serían tumores PRN, los GBCP GB subtipo CLS y los GS GB subtipo MES. Estas asociaciones no han sido confirmadas en el presente trabajo. Creemos que las primeras descripciones de Verhaak y col a este respecto deberían ser validadas en base al conocimiento actual. Así, por ejemplo, el GBCO ya no existe como entidad y durante mucho tiempo este subgrupo de tumores ha estado alimentado de OIII, hecho que podría explicar la asociación entre GBCO y GB PRN. De hecho, algunos trabajos han analizado la relación entre GBCO y subtipos transcriptómicos y encuentran que los GBCO no pertenecen de manera exclusiva al subtipo PRN (Hinrichs 2016).

### **V.2.2. Características moleculares y su relación ente sí y con las características histopatológicas**

Como ya se ha mencionado anteriormente cuando se ha hablado de la comparación entre modelos de *consensus clustering*, los resultados obtenidos para las variables IHQ son muy difíciles de comparar con los resultados publicados en la literatura, que utilizan diferentes aproximaciones (con o sin el empleo de TMA) y diferentes puntos de corte, además de diferentes anticuerpos a distintas concentraciones y diferentes sistemas de valoración de la positividad (como por ejemplo, la positividad para PTEN en relación o no a la positividad en las células endoteliales).

Sin embargo, para las variables no IHQ sí podemos comparar resultados con muchos de los estudios que utilizan la misma metodología y aplican los mismos puntos de corte. De este modo las frecuencias observadas en el presente estudio para *EGFRa* (42%) y *EGFRvIII* (27%) se encontrarían dentro de los rangos que se describen en las diferentes publicaciones, del orden del 40 al 60% para *EGFRa* y del 20 al 30% para *EGFRvIII* (Burger 2001, Ohgaki 2007, Maire 2014, Sugawa 1990). En cuanto a *PDGFRa*, y como ya se ha comentado, el criterio de positividad que se aplicó en este trabajo (>40% de las células tumorales con 6-12 copias del gen o alguna célula neoplásica con  $\geq 12$  copias del gen) difiere del que se describe en la mayor parte de las series de la literatura, que establecen como caso con amplificación aquel con una relación  $PDGFRa/CEP4 > 2$ , lo que dificulta la

comparación de nuestros resultados (Purkait 2016, Rodriguez 2008). No obstante, con nuestra definición de *PDGFRAa* obtuvimos una frecuencia de *PDGFRAa* del 16%, cercana al 15,8% de casos amplificadas descritos en estudios que utilizan qPCR o CISH (TCGA 2008, Martinho 2009). Phillips y col describen que, en su serie, hasta el 20,9% del total de los casos de GB en adultos mostraban *PDGFRAa*, y que esta frecuencia aumentaba al 43,6% en los casos de GB-IDHm (Phillips 2013). Si, en base a los datos que recogen las tablas de este trabajo, calculamos la frecuencia de *PDGFRAa* en el subgrupo de GB-IDHwt, ésta rondaría, una vez más, el 15,7%. El 38% de nuestros casos tenían *pMGMTmet*, una frecuencia que se sitúa en el rango de lo esperable en una población con escasos GB-IDHm y con una mediana de edad de 64 años (Wiestler 2013). Únicamente uno de los 64 casos estudiados mostró *IDHm*. Esto supone una frecuencia del 1,5%, inferior al 10% esperable de GB-IDHm. Creemos que este hecho se debe, al igual que comentábamos para la *pMGMTmet*, a que nuestra serie está constituida únicamente por pGB, sin historia previa de una lesión de menor grado, y por pacientes con edades avanzadas (sólo 6 pacientes eran menores de 50 años).

Para la discusión de la relación entre las diferentes características moleculares se comentarán únicamente aquellas que mostraron significación estadística. No obstante, debemos tener en cuenta que la existencia de significación o la ausencia de la misma puede estar influenciada por el bajo número de casos de nuestra serie (64 casos, muchas veces con incluso menos casos disponibles para la comparación).

Existía una relación entre *EGFRa* y *EGFRvIII*. Esta relación era esperable pues, tal y como se describe en todos los trabajos publicados, la práctica totalidad de los casos con *EGFRvIII* son casos con *EGFRa* (Aldape 2004, Brennan 2013, Maire 2014, Sugawa 1990). No obstante, y en referencia a este hecho, encontramos dos casos con *EGFRvIII* y sin *EGFRa*. Esto supone un hecho altamente infrecuente, aunque está descrito en la literatura (Aldape 2004). Una explicación lógica para estos dos casos podría ser la incapacidad de detectar una posible *EGFRa* de distribución heterogénea, probablemente debido al empleo de TMA (Snuderl 2011). Se ha descrito que los GB muestran mayor número de copias de *EGFR* en la porción periférica, infiltrante, del tumor que no en la porción central, que es la que habitualmente se selecciona para la construcción de los TMA (Okada 2003). Es por ello que repetimos el estudio de *EGFRa* sobre las secciones completas de estos dos tumores y comprobamos que, efectivamente, no existía amplificación en ninguno de ellos. También observamos relación entre la *EGFRa* y la pérdida de expresión de p16 y de PTEN. Esta relación también era esperable, pues se ha descrito una clara asociación entre la delección de *CDKN2A* y la *EGFRa* y entre estas alteraciones y el subtipo CLS (Brennan 2013,

Verhaak 2010, Zheng 2012). En cuanto a la pérdida de la expresión de PTEN, en manos de algunos autores es un marcador de GB de subtipo CLS, lo que podría explicar su asociación a *EGFRa* (Verhaak 2010).

El resto de relaciones con significación estadística que se observaron en este trabajo las podríamos explicar del mismo modo, en referencia a los estudios de PEG en GB, ya que no existen muchos más estudios en la literatura que analicen estas relaciones. Si las alteraciones de *CDKN2A* (que generarían una pérdida de la expresión proteica de p16) se concentran en los GB subtipo CLS, es lógico pensar que pueda existir una relación positiva entre la inmunoreactividad para p16 y para p53 (pues la *TP53m* sería un marcador más prevalente en GB subtipo PRN y MES) (Brennan 2013). Si *TP53m* es un marcador de GB MES, no sorprende su relación con la expresión de VIM, que también es un probable marcador de subtipo MES (Phillips 2006). Si las alteraciones de PTEN (con pérdida de la expresión proteica) son más propias del subtipo CLS, ya puede existir relación entre positividad (ausencia de pérdida de la expresión) para PTEN y un marcador MES como D2-40 (Verhaak 2010, Motomura 2012). Habría una relación inversa entre *PDGFRa* y VIM, de nuevo probablemente explicable por el hecho de que *PDGFRa* es un marcador de subtipo PRN y VIM de subtipo MES (Verhaak 2010, Phillips 2006). Creemos que el resto de relaciones significativas que hacen referencia a CD44 (con PGFA) y Olig2 (con p16 y *EGFRa*) no tendrían mucho sentido, porque, como antes mencionamos, no nos parece que exista una expresión diferencial, en nuestras manos, de CD44 ni Olig2 en los subgrupos de GB, como tampoco hemos creído en la expresión proteica de PDGFRA.

De modo análogo a lo que se ha descrito en la literatura, se revisaron las principales características histológicas de los tumores. Además de su composición celular, con células pequeñas o CGM, características éstas que ya se tuvieron en cuenta para la asignación de los casos a un determinado PH, también se analizó la presencia de proliferación microvascular (PMV) y de necrosis. Nuestros resultados con respecto a las variables histopatológicas merecen algunas aclaraciones. En primer lugar, llama la atención la elevada frecuencia de casos de GB que mostraron necrosis o PMV. A diferencia de las series de la literatura que describen frecuencias de en torno al 70%, hasta el 95% de los GB en la presente serie presentaban PMV tipo glomeruloide. De igual modo, 63 de los 64 casos tenían necrosis de algún tipo (isquémica o con empalizada), lo que contrasta con el 85% que se describe en el trabajo de Homma y col (Homma 2006). Con respecto a este último punto vale la pena comentar que en la presente serie únicamente teníamos un caso de GB-IDHm, que es el grupo de GB con menores niveles de necrosis (Nobusaka 2009). La frecuencia tan elevada de PMV y de necrosis hacen que sea difícil establecer relaciones entre éstas y otras

variables y puede que las relaciones encontradas y descritas en el apartado de resultados no tengan un valor real. Así, y como ejemplo, aunque algunos autores apuntan que la presencia de necrosis (con o sin empalizada) se correlaciona con una menor tasa de *TP53m* (Homma 2006), dado que únicamente detectamos un caso sin necrosis no hemos podido analizar esta relación. Se ha observado una relación con significación estadística entre la presencia de necrosis con empalizada y la *EGFRa*. Esta relación ya ha sido previamente mencionada en algunos trabajos (Miyayama 2008). También existía relación entre necrosis con empalizada y *EGFRvIII*, por un lado, y pérdida de la expresión de p16, por otro. Este hecho probablemente se deba a la estrecha asociación que existe entre estas dos alteraciones moleculares y la *EGFRa*, como ya hemos comentado.

Hasta el 41% de los casos tenían un componente de célula pequeña. Las diferentes series publicadas describen la presencia de un componente similar en el 11-36% de los casos de GB (Perry 2004, Burger 2001). Estos porcentajes tan variables creemos que podrían obedecer a dos motivos: a la manera de definir cuantitativamente cuándo un tumor se considera que tiene células pequeñas (medido, por ejemplo, por campos de gran aumento o por porcentaje del total de la celularidad, con puntos de corte variables) y también a la propia descripción del componente de célula pequeña. Aunque todos los autores coinciden en que son células de tamaño pequeño y con poco citoplasma, se aceptarían más o menos grados de atipia citológica que podrían englobar poblaciones celulares diferentes, algunas de aspecto muy inocente y otras de aspecto muy indiferenciado. El componente de célula pequeña ha sido relacionado con la *EGFRa*. Así, y como ejemplo, Burger y col han descrito que hasta el 32% de los GB con células pequeñas presentan *EGFRa* (Burger 2001). Esta relación es todavía más estrecha cuando hablamos del GBCP, donde hasta el 83% de los casos tienen *EGFRa* (Perry 2004). En el presente estudio se observó una relación con significación estadística entre el componente de célula pequeña y la *EGFRa*. De modo similar a lo que se ha descrito para la necrosis con empalizada, el componente de célula pequeña también mostró relación con *EGFRvIII* y, en esta ocasión, además con la pérdida de la expresión de PTEN. De nuevo, este hecho creemos que se explicaría por la estrecha asociación que existe entre estas dos alteraciones moleculares y la *EGFRa*.

Se estudió, también, la presencia de un componente de CGM. Se ha descrito una mayor frecuencia de *TP53m* y una menor frecuencia de *EGFRa* en los casos con mayor número de CGM (Homma 2006). En concordancia con anteriormente expuesto, en la presente serie observamos una relación entre la presencia de CGM e inmunotinción para p53, así como *EGFRa*, de tal modo que los casos con CGM presentaban mayores niveles de p53 y menores niveles de *EGFRa* cuando los comparábamos con los casos sin CGM. Una vez

más también se observó una relación entre la presencia de CGM y la ausencia de *EGFRvIII*, así como con la positividad para p16 y PTEN, todos ellos factores íntimamente relacionados.

A pesar de que la catalogación de estas variables morfológicas como ausentes o presentes no resulta en una valoración tan subjetiva como la asignación de un determinado PH, el hecho de que el GB constituya un tumor heterogéneo, el en que habitualmente no se dispone de la totalidad de la lesión para el estudio histológico, hace, de nuevo, que todas las consideraciones sobre variables morfológicas en estos tumores deban ser tomadas con mucha cautela.

### **V.3. Modelos de supervivencia más allá de los subgrupos moleculares de GB**

Los pacientes de nuestra serie presentaron una SG mediana de 13 meses, muy similar a los 15 meses que se describen en las series más amplias de la literatura (Stupp 2009). Esta pequeña diferencia en la SG probablemente se explica por el hecho de que, dado que muchos de nuestros casos fueron diagnosticados con anterioridad al año 2005, la gran mayoría de los pacientes no recibieron el tratamiento estándar con RT y TMZ (Stupp 2005). No obstante, 59 de los 64 pacientes fueron tratados con QT y RT, y 9 de ellos recibieron el esquema descrito por Stupp. Los resultados de los estudios de SG en pacientes que han recibido diferentes tratamientos deben siempre interpretarse con cautela. Para conocer si esta disparidad en el tratamiento podría constituir un factor de confusión importante, se analizó la diferencia en SG entre pacientes cuya QT se hubiera basado en agentes alquilantes (BCNU o el único caso tratado con Gliadel®) o en TMZ, sin observarse diferencias significativas. El KPS (definido como  $\geq$  o  $<$  de 70) y el tipo de cirugía (definida como biopsia vs resección parcial o completa) constituían factores pronósticos independientes en nuestras manos. Aunque los pacientes menores de 50 años mostraron una mediana de SG superior a los de mayor edad, la edad definida como  $\geq$  o  $<$  de 50 años, tal y como consta en la escala RPA, no constituyó un parámetro pronóstico con significación estadística en nuestra serie, quizás por el escaso número de pacientes menores de 50 años (únicamente 6). Sin embargo, situando el punto de corte en 66 años ( $\geq$  o  $<$  66 años) sí encontramos diferencias en la SG de los pacientes con significación estadística. Este hecho no debería extrañarnos, pues la edad mediana de los pacientes con GB es cada vez más elevada y diferente a las edades que se describen en los trabajos más antiguos.

No hemos contemplado la posibilidad de una pseudoprogresión tumoral (PsP). La PsP es un concepto radiológico que consiste en cambios transitorios en la barrera

hematoencefálica, debidos al tratamiento con irradiación. Estos cambios provocan un aumento de la captación de contraste y pueden confundirse con una progresión del tumor. Además, la PsP se acompaña con frecuencia de sintomatología clínica. Se trata de un cuadro clínico reversible, que se observa con mayor frecuencia en los pacientes que han recibido tratamiento combinado con QT y RT y en los pacientes con *pMGMTmet* (Brandes 2008). El diagnóstico erróneo de progresión puede equivocar la decisión terapéutica y la fecha de progresión, así como modificar la variable tiempo en la curva de supervivencia libre de progresión (SLP). Dado que nuestros casos son muy antiguos, en muchas de las ocasiones no se valoró la posibilidad de una PsP y, por ese motivo, en este trabajo no se ha contemplado la variable SLP a ningún efecto.

En nuestras manos, la *pMGMTmet* constituyó un factor de buen pronóstico, de manera análoga a lo que se describe en la literatura (Hegi 2005). De igual modo, se constató que tanto la *EGFRa* como la existencia de la forma mutada *EGFRvIII* definían grupos de pacientes con mejor pronóstico, aunque estos valores no se mantenían en los estudios multivariantes, donde ni la *EGFRa* ni *EGFRvIII* constituían factores independientes del KPS, el tipo de cirugía y la edad. Los estudios que han abordado el papel pronóstico de la *EGFRa* son múltiples y presentan resultados muy dispares. Algunos trabajos encuentran una mayor supervivencia en los pacientes con *EGFRa* (Smith 2001), mientras otros grupos lo han señalado como un factor de mal pronóstico (Saito 2006). Chen y col realizaron un metanálisis de los estudios publicados en la literatura a este respecto y aseguran que no existirían diferencias en SG entre los pacientes con y sin *EGFRa* (Chen 2015). No obstante, son varios los trabajos que han descrito que el valor pronóstico de la *EGFRa* podría depender de la edad de los pacientes y, así, entre el grupo de pacientes de más edad (por encima de 75, 60, 55 o 46 años, según los estudios), la existencia de *EGFRa* constituiría un factor de buen pronóstico (Batchelor 2004, Kleinschmidt-DeMasters 2005, Smith 2001, Simmons 2001). En la presente serie la mediana de edad de los pacientes fue de 64 años, lo que, en base a lo anteriormente expuesto podría explicar los resultados obtenidos. En cuanto al papel pronóstico de *EGFRvIII*, también existen diferentes opiniones en la literatura. Algunos autores describen que, entre los pacientes con *EGFRa*, aquellos que presentan la forma *EGFRvIII* tienen un peor pronóstico que los pacientes que únicamente muestran *EGFRa* (Heimberger 2005). El trabajo de Chen y col al que hacíamos referencia previamente describe que, en base a todo lo publicado en la literatura, no existirían diferencias en SG entre los pacientes con y sin *EGFRvIII* (Chen 2015).

El resto de marcadores moleculares (todos los marcadores IHQ y la *PDGFRAa*) no resultaron en marcadores con utilidad pronóstica. Con respecto a este punto creemos que

este dato no debería sorprendernos. Pensamos que un marcador IHQ, de manera individual, difícilmente va a poderse constituir un marcador pronóstico reconocido y de utilidad clínica en GB, a excepción de aquellos que indiquen la presencia de una mutación iniciadora (*driver*), como sería el caso de las *IDHm*. Por el contrario, modelos que incorporen paneles de marcadores IHQ sí pueden llegar a definir subgrupos de tumores con diferente comportamiento clínico, como se ha comprobado en los trabajos a los que hemos hecho referencia y en nuestro propio estudio.

#### V.4. Otras consideraciones

En los últimos meses hemos incorporado a nuestro trabajo el estudio de la inmunotinción para ATRX. No esperábamos encontrar más que un caso con pérdida de la expresión para ATRX, ya que únicamente existía un caso GB-IDHm en nuestra serie. No pudimos valorar la inmunotinción para ATRX de nuestro caso de GB-IDHm, pues los endotelios de la muestra (a modo de control interno de la tinción) mostraban una tinción nuclear leve y heterogénea. De entre los 45 casos evaluables, 3 de ellos mostraron pérdida de la expresión en más del 90% de las células tumorales. Existen diferentes puntos de corte en la literatura para definir un caso como *ATRXm*. Algunos autores defienden que un caso se considera *ATRXm* cuando ninguna de las células tumorales es positiva en el estudio IHQ (Abedalthagafi 2013), mientras otros criterios menos estrictos aconsejan puntos de corte del 10, del 15 o del 50% (Wiestler 2013, Jiao 2011, Gielen 2015). Nuestros tres casos con pérdida de la expresión para ATRX habían sido secuenciados y no mostraban *IDHm*. Además, los 3 casos habían sido catalogados como GB-P (PRN), con lo que, en principio, y según el estudio de Brennan y col en el que las *ATRXm* acontecen únicamente en el GB subtipo PRN (Brennan 2013), el conocimiento de esta variable no nos obligaba a reclasificar ninguno de nuestros tumores.

#### V.5. Limitaciones del estudio

Nuestro estudio presenta limitaciones, algunas de las cuales ya han sido mencionadas en diferentes momentos del texto. Una de las principales limitaciones es el escaso número de casos, lo que no permite asegurar la rigurosidad de las relaciones observadas ni la falta de relaciones que no se hayan podido detectar. La heterogeneidad tumoral que afecta a muchos tipos de neoplasias pero que es más evidente en el GB, como explicábamos hace un momento, es una limitación inherente a todo estudio con este tipo de tumores, pero es más acusada en los trabajos que analizan un escaso número de casos. Por otro lado, el hecho

de que no todos los pacientes hayan sido tratados de igual modo limita la interpretación de los resultados obtenidos en nuestros análisis de supervivencia.

Pero la principal limitación de este estudio, y de todos los estudios similares publicados hasta la fecha, es la ausencia del análisis en paralelo, es decir, en los mismos casos, de los perfiles de expresión génica (PEG), por un lado, y de los marcadores IHQ o no IHQ, por el otro. Este gran inconveniente es el que intentaría subsidiar el proyecto multinstitucional 665/C/2013, del que nuestro grupo forma parte, un proyecto financiado por la beca La Marató de la Fundación de TV3 y titulado “Perfiles de expresión génica (PEG) del glioblastoma, incluyendo lincRNA (*large intergenic non-coding RNA*), en una población homogénea: correlación con el inmunofenotipo, la radiología, el curso clínico y la respuesta a la terapia. Un estudio multicéntrico”. Como explica el propio nombre del proyecto, el objetivo de este estudio es clasificar una muestra de GB, recogidos de 6 hospitales diferentes, por PEG y relacionar estos resultados con la expresión IHQ de una serie de marcadores, así como también con las diferentes características clínicas y radiológicas de los pacientes. Nuestra idea es validar nuestro algoritmo de clasificación del GB en los casos de este proyecto.

## ***VI. Conclusiones***



1. Aplicando una metodología de *consensus clustering* a los resultados obtenidos del estudio inmunohistoquímico de p53, PTEN, CD44, Olig2, p16, D2-40, PDGFRA, VIM y PGFA, el estudio de la amplificación de *EGFR* y *PDGFRA* y el estudio de la forma *EGFRvIII* hemos identificado tres subgrupos (A, B y C) de glioblastomas (GB)
2. Estos tres subgrupos de GB (A, B y C) remedan los subtipos proneural, clásico y mesenquimal de la clasificación por perfiles de expresión génica, respectivamente
3. Creemos que la clasificación del GB por el método de *consensus clustering* no constituye una herramienta precisa ni suficientemente práctica para su utilización en el contexto clínico diario
4. Aplicando un algoritmo de clasificación tipo “árbol de decisión” al análisis secuencial de las mutaciones de *IDH*, la forma *EGFRvIII*, la amplificación de *PDGFRA*, la expresión inmunohistoquímica de p53 y p16, la amplificación de *EGFR* y la expresión inmunohistoquímica de D2-40 y CD44 hemos identificado tres subgrupos de GB (GB-P, GB-C y GB-M)
5. Estos tres subgrupos de GB (GB-P, GB-C y GB-M) remedan los subtipos proneural, clásico y mesenquimal de la clasificación por perfiles de expresión génica, respectivamente
6. Nuestro algoritmo de clasificación tipo “árbol de decisión” constituye una herramienta suficientemente precisa y de fácil implementación en la práctica diaria para la clasificación de los GB
7. Los tres subgrupos de GB (GB-P, GB-C y GB-M) presentan diferencias estadísticamente significativas en términos de supervivencia
8. Los pacientes con GB subgrupo GB-C (el que remeda el subtipo clásico de Verhaak) tienen una supervivencia superior a la de los otros subgrupos
9. La pertenencia al subgrupo GB-C constituye un factor de buen pronóstico, independientemente del tipo de cirugía, la edad y el índice de Karnofsky

## Conclusiones

10. No existe relación estadísticamente significativa entre los subgrupos de GB (GB-P, GB-C y GB-M) con los patrones histológicos ni con las variantes morfológicas de GB de la OMS
11. Los tres subgrupos de GB (GB-P, GB-C y GB-M) no presentan diferencias estadísticamente significativas en sus características clínicas ni radiológicas (sexo, edad, localización, multifocalidad)
12. Existe una asociación estadísticamente significativa entre los subgrupos de GB generados por nuestros dos modelos (el modelo de *consensus clustering* y el modelo de clasificación tipo “árbol de decisión”)
13. Tanto la amplificación de *EFGR* como la forma *EGFRvIII* son factores de buen pronóstico con significación estadística en nuestra serie
14. La inmunorreactividad para sinaptofisina no constituye un dato suficientemente fiable en los GB como para considerarla un marcador del subtipo neural, subtipo que no creemos exista realmente

## ***VII. Bibliografía***



**A**

**Abedalthagafi M**, Phillips JJ, Kim GE, Mueller S, Haas-Kogen DA, Marshall RE, Croul SE, Santi MR, Cheng J, Zhou S, Sullivan LM, Martinez-Lage M, Judkins AR, Perry A. The alternative lengthening of telomere phenotype is significantly associated with loss of ATRX expression in high-grade pediatric and adult astrocytomas: a multi-institutional study of 214 astrocytomas. *Mod Pathol.* 2013;26(11):1425-32

**Abu-Jamous B**, Fa R, Roberts DJ, Nandi AK. Paradigm of tunable clustering using Binarization of Consensus Partition Matrices (Bi-CoPaM) for gene discovery. *PLoS One.* 2013;8(2): e56432

**Aldape K**, Zadeh G, Mansouri S, Reifenberger G, von Deimling A. Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol.* 2015;129(6):829-48

**Aldape KD**, Ballman K, Furth A, Buckner JC, Giannini C, Burger PC, Scheithauer BW, Jenkins RB, James CD. Immunohistochemical detection of EGFRvIII in high malignancy grade astrocytomas and evaluation of prognostic significance. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2004;63(7):700-7

**Arita H**, Narita Y, Yoshida A, Hashimoto N, Yoshimine T, Ichimura K. IDH1/2 mutation detection in gliomas. *Brain Tumor Pathol.* 2015;32(2):79-89

**B**

**Bady P**, Sciuscio D, Diserens AC, Bloch J, van den Bent MJ, Marosi C, Dietrich PY, Weller M, Mariani L, Heppner FL, McDonald DR, Lacombe D, Stupp R, Delorenzi M, Hegi ME. MGMT methylation analysis of glioblastoma on the Infinium methylation BeadChip identifies two distinct CpG regions associated with gene silencing and outcome, yielding a prediction model for comparisons across datasets, tumor grades, and CIMP-status. *Acta Neuropathol.* 2012;124(4):547-60

**Bailey P**, Cushing H. A Classification of the Tumors of the Glioma Group on a Histogenetic Basis With a Correlated Study of Prognosis. Philadelphia: JB Lippincott Co; 1926

**Balaña C**, Carrato C, Ramírez JL, Cardona AF, Berdiel M, Sánchez JJ, Tarón M, Hostalot C, Musulen E, Ariza A, Rosell R. Tumour and serum MGMT promoter methylation and protein expression in glioblastoma patients. *Clin Transl Oncol*. 2011;13(9):677-85

**Barnholtz-Sloan JS**, Williams VL, Maldonado JL, Shahani D, Stockwell HG, Chamberlain M, Sloan AE. Patterns of care and outcomes among elderly individuals with primary malignant astrocytoma. *J Neurosurg*. 2008;108(4):642-8

**Batchelor TT**, Betensky RA, Esposito JM, Pham LD, Dorfman MV, Piscatelli N, Jhung S, Rhee D, Louis DN. Age-dependent prognostic effects of genetic alterations in glioblastoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10(1 Pt 1):228-33

**Batzdorf U**, Malamud N. The problem of multicentric gliomas. *J Neurosurg*. 1963;20:122-36

**Berghoff AS**, Stefanits H, Woehrer A, Heinzl H, Preusser M, Hainfellner JA; Vienna Comprehensive Cancer Center Central Nervous System Unit. Clinical neuropathology practice guide 3-2013: levels of evidence and clinical utility of prognostic and predictive candidate brain tumor biomarkers. *Clin Neuropathol*. 2013;32(3):148-58

**Bhat KP**, Balasubramaniyan V, Vaillant B, Ezhilarasan R, Hummelink K, Hollingsworth F, Wani K, Heathcock L, James JD, Goodman LD, Conroy S, Long L, Lelic N, Wang S, Gumin J, Raj D, Kodama Y, Raghunathan A, Olar A, Joshi K, Pelloski CE, Heimberger A, Kim SH, Cahill DP, Rao G, Den Dunnen WF, Boddeke HW, Phillips HS, Nakano I, Lang FF, Colman H, Sulman EP, Aldape K. Mesenchymal differentiation mediated by NF- $\kappa$ B promotes radiation resistance in glioblastoma. *Cancer Cell*. 2013 9;24(3):331-46

**Birner P**, Piribauer M, Fischer I, Gatterbauer B, Marosi C, Ungersböck K, Rössler K, Budka H, Hainfellner JA. Prognostic relevance of p53 protein expression in glioblastoma. *Oncol Rep*. 2002;9(4):703-7

**Brandes AA**, Franceschi E, Tosoni A, Blatt V, Pession A, Tallini G, Bertorelle R, Bartolini S, Calbucci F, Andreoli A, Frezza G, Leonardi M, Spagnoli F, Ermani M. MGMT promoter methylation status can predict the incidence and outcome of pseudoprogression after concomitant radiochemotherapy in newly diagnosed glioblastoma patients. *J Clin Oncol*. 2008;26(13):2192-7

**Bredel M**, Scholtens DM, Harsh GR, Bredel C, Chandler JP, Renfrow JJ, Yadav AK, Vogel H, Scheck AC, Tibshirani R, Sikic BI. A network model of a cooperative genetic landscape in brain tumors. *JAMA*. 2009 Jul 15;302(3):261-75

**Brennan CW**, Verhaak RG, McKenna A, Campos B, Noushmehr H, Salama SR, Zheng S, Chakravarty D, Sanborn JZ, Berman SH, Beroukhi R, Bernard B, Wu CJ, Genovese G, Shmulevich I, Barnholtz-Sloan J, Zou L, Vegesna R, Shukla SA, Ciriello G, Yung WK, Zhang W, Sougnez C, Mikkelsen T, Aldape K, Bigner DD, Van Meir EG, Prados M, Sloan A, Black KL, Eschbacher J, Finocchiaro G, Friedman W, Andrews DW, Guha A, Iacocca M, O'Neill BP, Foltz G, Myers J, Weisenberger DJ, Penny R, Kucherlapati R, Perou CM, Hayes DN, Gibbs R, Marra M, Mills GB, Lander E, Spellman P, Wilson R, Sander C, Weinstein J, Meyerson M, Gabriel S, Laird PW, Haussler D, Getz G, Chin L; TCGA Research Network.. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell*. 2013;155(2):462-77

**Broniscer A**, Gajjar A. Supratentorial high-grade astrocytoma and diffuse brainstem glioma: two challenges for the pediatric oncologist. *Oncologist*. 2004;9(2):197-206

**Broniscer A**, Tatevossian RG, Sabin ND, Klimo P Jr, Dalton J, Lee R, Gajjar A, Ellison DW. Clinical, radiological, histological and molecular characteristics of paediatric epithelioid glioblastoma. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2014;40(3):327-36

**Brown KE**, Chagoya G, Kwatra SG, Yen T, Keir ST, Cooter M, Hoadley KA, Rasheed A, Lipp ES, Mclendon R, Ali-Osman F, Bigner DD, Sampson JH, Kwatra MM. Proteomic profiling of patient-derived glioblastoma xenografts identifies a subset with activated EGFR: implications for drug development. *J Neurochem*. 2015;133(5):730-8

**Buczkwicz P**, Hawkins C. Pathology, Molecular Genetics, and Epigenetics of Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Front Oncol*. 2015;5:147

**Burger PC**, Pearl DK, Aldape K, Yates AJ, Scheithauer BW, Passe SM, Jenkins RB, James CD. Small cell architecture--a histological equivalent of EGFR amplification in glioblastoma multiforme? *J Neuropathol Exp Neurol*. 2001;60(11):1099-104

**Burger PC**, Scheithauer BW. AFIP atlas of tumor pathology series 4. Tumors of the central nervous system. Washington DC: ARP Press, 2007

**C**

**Camelo-Piragua S**, Jansen M, Ganguly A, Kim JC, Cospers AK, Dias-Santagata D, Nutt CL, Iafrate AJ, Louis DN. A sensitive and specific diagnostic panel to distinguish diffuse astrocytoma from astrocytosis: chromosome 7 gain with mutant isocitrate dehydrogenase 1 and p53. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2011;70(2):110-5

**Capper D**, Zentgraf H, Balss J, Hartmann C, von Deimling A. Monoclonal antibody specific for IDH1 R132H mutation. *Acta Neuropathol.* 2009;118(5):599-601

**Ceccarelli M**, Barthel FP, Malta TM, Sabedot TS, Salama SR, Murray BA, Morozova O, Newton Y, Radenbaugh A, Pagnotta SM, Anjum S, Wang J, Manyam G, Zoppoli P, Ling S, Rao AA, Grifford M, Cherniack AD, Zhang H, Poisson L, Carlotti CG Jr, Tirapelli DP, Rao A, Mikkelsen T, Lau CC, Yung WK, Rabadan R, Huse J, Brat DJ, Lehman NL, Barnholtz-Sloan JS, Zheng S, Hess K, Rao G, Meyerson M, Beroukhi R, Cooper L, Akbani R, Wrensch M, Haussler D, Aldape KD, Laird PW, Gutmann DH; TCGA Research Network., Noushmehr H, Iavarone A, Verhaak RG. Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma. *Cell.* 2016;164(3):550-63

**Cerami E**, Demir E, Schultz N, Taylor BS, Sander C. Automated network analysis identifies core pathways in glioblastoma. *PLoS One.* 2010;5(2):e8918

**Chen JR**, Xu HZ, Yao Y, Qin ZY. Prognostic value of epidermal growth factor receptor amplification and EGFRvIII in glioblastoma: meta-analysis. *Acta Neurol Scand.* 2015;132(5):310-22

**Clynes D**, Gibbons RJ. ATRX and the replication of structured DNA. *Curr Opin Genet Dev.* 2013;23(3):289-94

**Colman H**, Zhang L, Sulman EP, McDonald JM, Shooshtari NL, Rivera A, Popoff S, Nutt CL, Louis DN, Cairncross JG, Gilbert MR, Phillips HS, Mehta MP, Chakravarti A, Pelloski CE, Bhat K, Feuerstein BG, Jenkins RB, Aldape K. A multigene predictor of outcome in glioblastoma. *Neuro Oncol.* 2010;12(1):49-57

**Connelly JH**, Bruner JM, Robey-Cafferty SS, Sahin A. p53 protein expression in transitional mucosa and adenocarcinomas of the colorectum. *Mod Pathol.* 1992;5(5):537-9

**Conroy S**, Kruyt FA, Joseph JV, Balasubramaniyan V, Bhat KP, Wagemakers M, Enting RH, Walenkamp AM, den Dunnen WF. Subclassification of newly diagnosed glioblastomas through an immunohistochemical approach. *PLoS One*. 2014;9(12): e115687

**Cooper LA**, Gutman DA, Long Q, Johnson BA, Cholleti SR, Kurc T, Saltz JH, Brat DJ, Moreno CS. The proneural molecular signature is enriched in oligodendrogliomas and predicts improved survival among diffuse gliomas. *PLoS One*. 2010;5(9):e12548

**Curran WJ Jr**, Scott CB, Horton J, Nelson JS, Weinstein AS, Fischbach AJ, Chang CH, Rotman M, Asbell SO, Krisch RE, et al. Recursive partitioning analysis of prognostic factors in three Radiation Therapy Oncology Group malignant glioma trials. *J Natl Cancer Inst*. 1993;85(9):704-10

## D

**Dei Tos AP**, Ellis I. Assessing epidermal growth factor receptor expression in tumours: what is the value of current test methods? *Eur J Cancer*. 2005;41(10):1383-92

**Djalilian HR**, Shah MV, Hall WA. Radiographic incidence of multicentric malignant gliomas. *Surg Neurol*. 1999;51(5):554-7

**Ducrest AL**, Szutorisz H, Lingner J, Nabholz M. Regulation of the human telomerase reverse transcriptase gene. *Oncogene*. 2002;21(4):541-52

## E

**Eckel-Passow JE**, Lachance DH, Molinaro AM, Walsh KM, Decker PA, Sicotte H, Pekmezci M, Rice T, Kosel ML, Smirnov IV, Sarkar G, Caron AA, Kollmeyer TM, Praska CE, Chada AR, Halder C, Hansen HM, McCoy LS, Bracci PM, Marshall R, Zheng S, Reis GF, Pico AR, O'Neill BP, Buckner JC, Giannini C, Huse JT, Perry A, Tihan T, Berger MS, Chang SM, Prados MD, Wiemels J, Wiencke JK, Wrensch MR, Jenkins RB. Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors. *N Engl J Med*. 2015;372(26):2499-508

**Esteller M**, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin

SB, Herman JG. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med.* 2000;343(19):1350-4

**Esteller M**, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res.* 1999;59(4):793-7

## F

**Figarella-Branger D**, Mokhtari K, Colin C, Uro-Coste E, Jouvét A, Dehais C, Carpentier C, Villa C, Maurage CA, Eimer S, Polivka M, Vignaud JM, Laquerrière A, Sevestre H, Lechapt-Zalcman E, Quintin-Roué I, Aubriot-Lorton MH, Diebold MD, Viennet G, Adam C, Loussouarn D, Michalak S, Rigau V, Heitzmann A, Vandebos F, Forest F, Chiforeanu D, Tortel MC, Labrousse F, Chenard MP, Nguyen AT, Varlet P, Kemeny JL, Levillain PM, Cazals-Hatem D, Richard P, Delattre JY; POLA Network. Prognostic Relevance of Histomolecular Classification of Diffuse Adult High-Grade Gliomas with Necrosis. *Brain Pathol.* 2015;25(4):418-28

**Flynn RL**, Cox KE, Jeitany M, Wakimoto H, Bryll AR, Ganem NJ, Bersani F, Pineda JR, Suvà ML, Benes CH, Haber DA, Boussin FD, Zou L. Alternative lengthening of telomeres renders cancer cells hypersensitive to ATR inhibitors. *Science.* 2015;347(6219):273-7

**Freije WA**, Castro-Vargas FE, Fang Z, Horvath S, Cloughesy T, Liau LM, Mischel PS, Nelson SF. Gene expression profiling of gliomas strongly predicts survival. *Cancer Res.* 2004;64(18):6503-10

## G

**Gielen GH**, Gessi M, Buttarelli FR, Baldi C, Hammes J, zur Muehlen A, Doerner E, Denkhaus D, Warmuth-Metz M, Giangaspero F, Lauriola L, von Bueren AO, Kramm CM, Waha A, Pietsch T. Genetic Analysis of Diffuse High-Grade Astrocytomas in Infancy Defines a Novel Molecular Entity. *Brain Pathol.* 2015;25(4):409-17

**Gillet E**, Alentorn A, Doukouré B, Mundwiller E, van Thuijl HF, Reijneveld JC, Medina JA, Liou A, Marie Y, Mokhtari K, Hoang-Xuan K, Sanson M, Delattre JY, Idbaih A. TP53 and

p53 statuses and their clinical impact in diffuse low grade gliomas. *J Neurooncol.* 2014;118(1):131-9

**Gutman DA**, Cooper LA, Hwang SN, Holder CA, Gao J, Aurora TD, Dunn WD Jr, Scarpace L, Mikkelsen T, Jain R, Wintermark M, Jilwan M, Raghavan P, Huang E, Clifford RJ, Mongkolwat P, Kleper V, Freymann J, Kirby J, Zinn PO, Moreno CS, Jaffe C, Colen R, Rubin DL, Saltz J, Flanders A, Brat DJ. MR imaging predictors of molecular profile and survival: multi-institutional study of the TCGA glioblastoma data set. *Radiology.* 2013;267(2):560-9

## H

**Han SJ**, Yang I, Tihan T, Prados MD, Parsa AT. Primary gliosarcoma: key clinical and pathologic distinctions from glioblastoma with implications as a unique oncologic entity. *J Neurooncol.* 2010;96(3):313-20

**Hartmann C**, Hentschel B, Wick W, Capper D, Felsberg J, Simon M, Westphal M, Schackert G, Meyermann R, Pietsch T, Reifenberger G, Weller M, Loeffler M, von Deimling A. Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas. *Acta Neuropathol.* 2010;120(6):707-18

**Heaphy CM**, de Wilde RF, Jiao Y, Klein AP, Edil BH, Shi C, Bettegowda C, Rodriguez FJ, Eberhart CG, Hebbbar S, Offerhaus GJ, McLendon R, Rasheed BA, He Y, Yan H, Bigner DD, Oba-Shinjo SM, Marie SK, Riggins GJ, Kinzler KW, Vogelstein B, Hruban RH, Maitra A, Papadopoulos N, Meeker AK. Altered telomeres in tumors with ATRX and DAXX mutations. *Science.* 2011;333(6041):425

**Hegi ME**, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352(10):997-1003

**Hinrichs BH**, Newman S, Appin CL, Dunn W, Cooper L, Pauly R, Kowalski J, Rossi MR, Brat DJ. Farewell to GBM-O: Genomic and transcriptomic profiling of glioblastoma with oligodendroglioma component reveals distinct molecular subgroups. *Acta Neuropathol Commun.* 2016;4:4

**Homma T**, Fukushima T, Vaccarella S, Yonekawa Y, Di Patre PL, Franceschi S, Ohgaki H. Correlation among pathology, genotype, and patient outcomes in glioblastoma. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006;65(9):846-54

**Horbinski C**, Miller CR, Perry A. Gone FISHing: clinical lessons learned in brain tumor molecular diagnostics over the last decade. *Brain Pathol*. 2011;21(1):57-73

**Huang FW**, Hodis E, Xu MJ, Kryukov GV, Chin L, Garraway LA. Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma. *Science*. 2013;339(6122):957-9

**Huse JT**, Phillips HS, Brennan CW. Molecular subclassification of diffuse gliomas: seeing order in the chaos. *Glia*. 2011;59(8):1190-9

**Huse JT**, Aldape KD. The evolving role of molecular markers in the diagnosis and management of diffuse glioma. *Clin Cancer Res*. 2014;20(22):5601-11

## I

**Ilyas M**, Grabsch H, Ellis IO, Womack C, Brown R, Berney D, Fennell D, Salto-Tellez M, Jenkins M, Landberg G, Byers R, Treanor D, Harrison D, Green AR, Ball G, Hamilton P; National Cancer Research Institute (UK) Biomarker and Imaging Clinical Studies Group. Guidelines and considerations for conducting experiments using tissue microarrays. *Histopathology*. 2013;62(6):827-39

## J

**Jänne PA**, Engelman JA, Johnson BE. Epidermal growth factor receptor mutations in non-small-cell lung cancer: implications for treatment and tumor biology. *J Clin Oncol*. 2005;23(14):3227-34

**Jenkins RB**, Blair H, Ballman KV, Giannini C, Arusell RM, Law M, Flynn H, Passe S, Felten S, Brown PD, Shaw EG, Buckner JC. A t(1;19) (q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma. *Cancer Res*. 2006;66(20):9852-61

**Jeuken J**, Sijben A, Alenda C, Rijntjes J, Dekkers M, Boots-Sprenger S, McLendon R, Wesseling P. Robust detection of EGFR copy number changes and EGFR variant III: technical aspects and relevance for glioma diagnostics. *Brain Pathol.* 2009;19(4):661-71

**Jiao Y**, Shi C, Edil BH, de Wilde RF, Klimstra DS, Maitra A, Schulick RD, Tang LH, Wolfgang CL, Choti MA, Velculescu VE, Diaz LA Jr, Vogelstein B, Kinzler KW, Hruban RH, Papadopoulos N. DAXX/ATRX, MEN1, and mTOR pathway genes are frequently altered in pancreatic neuroendocrine tumors. *Science.* 2011;331(6021):1199-203

**Jiao Y**, Killela PJ, Reitman ZJ, Rasheed AB, Heaphy CM, de Wilde RF, Rodriguez FJ, Rosemberg S, Oba-Shinjo SM, Nagahashi Marie SK, Bettegowda C, Agrawal N, Lipp E, Pirozzi C, Lopez G, He Y, Friedman H, Friedman AH, Riggins GJ, Holdhoff M, Burger P, McLendon R, Bigner DD, Vogelstein B, Meeker AK, Kinzler KW, Papadopoulos N, Diaz LA, Yan H. Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas. *Oncotarget.* 2012;3(7):709-22

**Jones C**, Karajannis MA, Jones DT, Kieran MW, Monje M, Baker SJ, Becher OJ, Cho YJ, Gupta N, Hawkins C, Hargrave D, Haas-Kogan DA, Jabado N, Li XN, Mueller S, Nicolaides T, Packer RJ, Persson AI, Phillips JJ, Simonds EF, Stafford JM, Tang Y, Pfister SM, Weiss WA. Pediatric high-grade glioma: biologically and clinically in need of new thinking. *Neuro Oncol.* 2016 Jun 9. pii: now101.

**Joseph JV**, Conroy S, Tomar T, Eggens-Meijer E, Bhat K, Copray S, Walenkamp AM, Boddeke E, Balasubramanyian V, Wagemakers M, den Dunnen WF, Kruyt FA. TGF- $\beta$  is an inducer of ZEB1-dependent mesenchymal transdifferentiation in glioblastoma that is associated with tumor invasion. *Cell Death Dis.* 2014;5:e1443

## K

**Kannan K**, Inagaki A, Silber J, Gorovets D, Zhang J, Kasthuber ER, Heguy A, Petrini JH, Chan TA, Huse JT. Whole-exome sequencing identifies ATRX mutation as a key molecular determinant in lower-grade glioma. *Oncotarget.* 2012;3(10):1194-203

**Karsy M**, Gelbman M, Shah P, Balumbu O, Moy F, Arslan E. Established and emerging variants of glioblastoma multiforme: review of morphological and molecular features. *Folia Neuropathol.* 2012;50(4):301-21

**Kato Y.** Specific monoclonal antibodies against IDH1/2 mutations as diagnostic tools for gliomas. *Brain Tumor Pathol.* 2015;32(1):3-11

**Kersting C,** Packeisen J, Leidinger B, Brandt B, von Wasielewski R, Winkelmann W, van Diest PJ, Gosheger G, Buerger H. Pitfalls in immunohistochemical assessment of EGFR expression in soft tissue sarcomas. *J Clin Pathol.* 2006;59(6):585-90

**Kesari S,** Ramakrishna N, Sauvageot C, Stiles CD, Wen PY. Targeted molecular therapy of malignant gliomas. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2005;5(3):186-97

**Killela PJ,** Reitman ZJ, Jiao Y, Bettegowda C, Agrawal N, Diaz LA Jr, Friedman AH, Friedman H, Gallia GL, Giovanella BC, Grollman AP, He TC, He Y, Hruban RH, Jallo GI, Mandahl N, Meeker AK, Mertens F, Netto GJ, Rasheed BA, Riggins GJ, Rosenquist TA, Schiffman M, Shih IeM, Theodorescu D, Torbenson MS, Velculescu VE, Wang TL, Wentzensen N, Wood LD, Zhang M, McLendon RE, Bigner DD, Kinzler KW, Vogelstein B, Papadopoulos N, Yan H. TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(15):6021-6

**Kim S,** Dougherty ER, Shmulevich I, Hess KR, Hamilton SR, Trent JM, Fuller GN, Zhang W. Identification of combination gene sets for glioma classification. *Mol Cancer Ther.* 2002;1(13):1229-36

**Kleinschmidt-DeMasters BK,** Lillehei KO, Varella-Garcia M. Glioblastomas in the older old. *Arch Pathol Lab Med.* 2005;129(5):624-31

**Kleinschmidt-DeMasters BK,** Aisner DL, Birks DK, Foreman NK. Epithelioid GBMs show a high percentage of BRAF V600E mutation. *Am J Surg Pathol.* 2013;37(5):685-98

**Koelsche C,** Sahm F, Capper D, Reuss D, Sturm D, Jones DT, Kool M, Northcott PA, Wiestler B, Böhmer K, Meyer J, Mawrin C, Hartmann C, Mittelbronn M, Platten M, Brokinkel B, Seiz M, Herold-Mende C, Unterberg A, Schittenhelm J, Weller M, Pfister S, Wick W, Korshunov A, von Deimling A. Distribution of TERT promoter mutations in pediatric and adult tumors of the nervous system. *Acta Neuropathol.* 2013;126(6):907-15

**Korshunov A**, Sycheva R, Golanov A. Molecular stratification of diagnostically challenging high-grade gliomas composed of small cells: the utility of fluorescence in situ hybridization. *Clin Cancer Res.* 2004;10(23):7820-6

**Kozak KR**, Moody JS. Giant cell glioblastoma: a glioblastoma subtype with distinct epidemiology and superior prognosis. *Neuro Oncol.* 2009;11(6):833-41

## L

**Labussière M**, Boisselier B, Mokhtari K, Di Stefano AL, Rahimian A, Rossetto M, Ciccarino P, Saulnier O, Paterra R, Marie Y, Finocchiaro G, Sanson M. Combined analysis of TERT, EGFR, and IDH status defines distinct prognostic glioblastoma classes. *Neurology.* 2014;83(13):1200-6

**Lai A**, Kharbanda S, Pope WB, Tran A, Solis OE, Peale F, Forrest WF, Pujara K, Carrillo JA, Pandita A, Ellingson BM, Bowers CW, Soriano RH, Schmidt NO, Mohan S, Yong WH, Seshagiri S, Modrusan Z, Jiang Z, Aldape KD, Mischel PS, Liau LM, Escovedo CJ, Chen W, Nghiemphu PL, James CD, Prados MD, Westphal M, Lamszus K, Cloughesy T, Phillips HS. Evidence for sequenced molecular evolution of IDH1 mutant glioblastoma from a distinct cell of origin. *J Clin Oncol.* 2011;29(34):4482-90

**Le Mercier M**, Hastir D, Moles Lopez X, De Nève N, Maris C, Trepant AL, Rorive S, Decaestecker C, Salmon I. A simplified approach for the molecular classification of glioblastomas. *PLoS One.* 2012;7(9):e45475

**Lee D**, Kang SY, Suh YL, Jeong JY, Lee JI, Nam DH. Clinicopathologic and genomic features of gliosarcomas. *J Neurooncol.* 2012;107(3):643-50

**Lee Y**, Scheck AC, Cloughesy TF, Lai A, Dong J, Farooqi HK, Liau LM, Horvath S, Mischel PS, Nelson SF. Gene expression analysis of glioblastomas identifies the major molecular basis for the prognostic benefit of younger age. *BMC Med Genomics.* 2008 Oct 21;1:52

**Li A**, Walling J, Ahn S, Kotliarov Y, Su Q, Quezado M, Oberholtzer JC, Park J, Zenklusen JC, Fine HA. Unsupervised analysis of transcriptomic profiles reveals six glioma subtypes. *Cancer Res.* 2009;69(5):2091-9

**Liang Y**, Kelemen A. Associating phenotypes with molecular events: recent statistical advances and challenges underpinning microarray experiments. *Funct Integr Genomics*. 2006;6(1):1-13

**Ligon KL**, Alberta JA, Kho AT, Weiss J, Kwaan MR, Nutt CL, Louis DN, Stiles CD, Rowitch DH. The oligodendroglial lineage marker OLIG2 is universally expressed in diffuse gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2004;63(5):499-509

**Liu XY**, Gerges N, Korshunov A, Sabha N, Khuong-Quang DA, Fontebasso AM, Fleming A, Hadjadj D, Schwartzentruber J, Majewski J, Dong Z, Siegel P, Albrecht S, Croul S, Jones DT, Kool M, Tonjes M, Reifenberger G, Faury D, Zadeh G, Pfister S, Jabado N. Frequent ATRX mutations and loss of expression in adult diffuse astrocytic tumors carrying IDH1/IDH2 and TP53 mutations. *Acta Neuropathol*. 2012;124(5):615-25

**Louis DN**, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK. WHO classification of tumours of the central nervous system. 4th ed. Lyon, France: IARC Press, 2007

**Louis DN**, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK. WHO classification of tumours of the central nervous system. 4th ed Revised. Lyon, France: IARC Press, 2016

**Louis DN**, Perry A, Burger P, Ellison DW, Reifenberger G, von Deimling A, Aldape K, Brat D, Collins VP, Eberhart C, Figarella-Branger D, Fuller GN, Giangaspero F, Giannini C, Hawkins C, Kleihues P, Korshunov A, Kros JM, Beatriz Lopes M, Ng HK, Ohgaki H, Paulus W, Pietsch T, Rosenblum M, Rushing E, Soylemezoglu F, Wiestler O, Wesseling P; International Society Of Neuropathology--Haarlem. International Society Of Neuropathology--Haarlem consensus guidelines for nervous system tumor classification and grading. *Brain Pathol*. 2014;24(5):429-35

**Louis DN**, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*. 2016;131(6):803-20

**Lutterbach J**, Guttenberger R, Pagenstecher A. Gliosarcoma: a clinical study. *Radiother Oncol*. 2001;61(1):57-64

**Lv B**, Yang X, Lv S, Wang L, Fan K, Shi R, Wang F, Song H, Ma X, Tan X, Xu K, Xie J, Wang G, Feng M, Zhang L. CXCR4 Signaling Induced Epithelial-Mesenchymal Transition by PI3K/AKT and ERK Pathways in Glioblastoma. *Mol Neurobiol*. 2015;52(3):1263-8

**Lynch TJ**, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. 2004;350(21):2129-3

## **M**

**Mahabir R**, Tanino M, Elmansuri A, Wang L, Kimura T, Itoh T, Ohba Y, Nishihara H, Shirato H, Tsuda M, Tanaka S. Sustained elevation of Snail promotes glial-mesenchymal transition after irradiation in malignant glioma. *Neuro Oncol*. 2014;16(5):671-85

**Maire CL**, Ligon KL. Molecular pathologic diagnosis of epidermal growth factor receptor. *Neuro Oncol*. 2014;16 Suppl 8:viii1-6

**Mallory FB**. *The Principles of Pathologic Histology*. Philadelphia, Pa: WB Saunders Co; 1914

**Malmström A**, Grønberg BH, Marosi C, Stupp R, Frappaz D, Schultz H, Abacioglu U, Tavelin B, Lhermitte B, Hegi ME, Rosell J, Henriksson R; Nordic Clinical Brain Tumour Study Group (NCBTSG). Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2012;13(9):916-26

**Martinho O**, Longatto-Filho A, Lambros MB, Martins A, Pinheiro C, Silva A, Pardal F, Amorim J, Mackay A, Milanezi F, Tamber N, Fenwick K, Ashworth A, Reis-Filho JS, Lopes JM, Reis RM. Expression, mutation and copy number analysis of platelet-derived growth factor receptor A (PDGFRA) and its ligand PDGFA in gliomas. *Br J Cancer*. 2009;101(6):973-82

**Masui K**, Mischel PS, Reifenberger G. Molecular classification of gliomas. *Handb Clin Neurol*. 2016;134:97-120

**Mellinghoff IK**, Wang MY, Vivanco I, Haas-Kogan DA, Zhu S, Dia EQ, Lu KV, Meyer-Puttlitz B, Hayashi Y, Waha A, Rollbrocker B, Boström J, Wiestler OD, Louis DN, Reifenberger G, von Deimling A. Molecular genetic analysis of giant cell glioblastomas. *Am J Pathol.* 1997;151(3):853-7

**Meyer-Puttlitz B**, Hayashi Y, Waha A, Rollbrocker B, Boström J, Wiestler OD, Louis DN, Reifenberger G, von Deimling A. Molecular genetic analysis of giant cell glioblastomas. *Am J Pathol.* 1997;151(3):853-7

**Miller CR**, Dunham CP, Scheithauer BW, Perry A. Significance of necrosis in grading of oligodendroglial neoplasms: a clinicopathologic and genetic study of newly diagnosed high-grade gliomas. *J Clin Oncol.* 2006;24(34):5419-26

**Miller CR**, Perry A. Glioblastoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2007;131(3):397-406

**Mirimanoff RO**, Gorlia T, Mason W, Van den Bent MJ, Kortmann RD, Fisher B, Reni M, Brandes AA, Curschmann J, Villa S, Cairncross G, Allgeier A, Lacombe D, Stupp R. Radiotherapy and temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: recursive partitioning analysis of the EORTC 26981/22981-NCIC CE3 phase III randomized trial. *J Clin Oncol.* 2006;24(16):2563-9

**Mischel PS**, Shai R, Shi T, Horvath S, Lu KV, Choe G, Seligson D, Kremen TJ, Palotie A, Liau LM, Cloughesy TF, Nelson SF. Identification of molecular subtypes of glioblastoma by gene expression profiling. *Oncogene.* 2003;22(15):2361-73

**Miyanaga T**, Hirato J, Nakazato Y. Amplification of the epidermal growth factor receptor gene in glioblastoma: an analysis of the relationship between genotype and phenotype by CISH method. *Neuropathology.* 2008;28(2):116-26

**Momota H**, Iwami K, Fujii M, Motomura K, Natsume A, Ogino J, Hasegawa T, Wakabayashi T. Rhabdoid glioblastoma in a child: case report and literature review. *Brain Tumor Pathol.* 2011;28(1):65-70

**Moscato D**, Pegram CN, Reist CJ, et al. Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas. *Cancer Res.* 1995;55(14):3140-8

**Motomura K**, Natsume A, Watanabe R, Ito I, Kato Y, Momota H, Nishikawa R, Mishima K, Nakasu Y, Abe T, Namba H, Nakazato Y, Tashiro H, Takeuchi I, Mori T, Wakabayashi T. Immunohistochemical analysis-based proteomic subclassification of newly diagnosed glioblastomas. *Cancer Sci.* 2012;103(10):1871-9

**Muller PA**, Vousden KH. p53 mutations in cancer. *Nat Cell Biol.* 2013;15(1):2-8

## N

**Neumann JE**, Dorostkar MM, Korshunov A, Mawrin C, Koch A, Giese A, Schüller U. Distinct Histomorphology in Molecular Subgroups of Glioblastomas in Young Patients. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2016;75(5):408-14

**Newcomb EW**, Cohen H, Lee SR, Bhalla SK, Bloom J, Hayes RL, Miller DC. Survival of patients with glioblastoma multiforme is not influenced by altered expression of p16, p53, EGFR, MDM2 or Bcl-2 genes. *Brain Pathol.* 1998;8(4):655-67

**Nobusawa S**, Watanabe T, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. *Clin Cancer Res.* 2009;15(19):6002-7

**Nonoguchi N**, Ohta T, Oh JE, Kim YH, Kleihues P, Ohgaki H. TERT promoter mutations in primary and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol.* 2013;126(6):931-7

**Noushmehr H**, Weisenberger DJ, Diefes K, Phillips HS, Pujara K, Berman BP, Pan F, Pelloski CE, Sulman EP, Bhat KP, Verhaak RG, Hoadley KA, Hayes DN, Perou CM, Schmidt HK, Ding L, Wilson RK, Van Den Berg D, Shen H, Bengtsson H, Neuvial P, Cope LM, Buckley J, Herman JG, Baylin SB, Laird PW, Aldape K; Cancer Genome Atlas Research Network. Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell.* 2010;17(5):510-22

**Nutt CL**, Mani DR, Betensky RA, Tamayo P, Cairncross JG, Ladd C, Pohl U, Hartmann C, McLaughlin ME, Batchelor TT, Black PM, von Deimling A, Pomeroy SL, Golub TR, Louis DN. Gene expression-based classification of malignant gliomas correlates better with survival than histological classification. *Cancer Res.* 2003;63(7):1602-7

**O**

**Ohgaki H**, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, Burkhard C, Schüler D, Probst-Hensch NM, Maiorka PC, Baeza N, Pisani P, Yonekawa Y, Yasargil MG, Lütolf UM, Kleihues P. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res.* 2004;64(19):6892-9

**Ohgaki H**, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 2007;170:1445–53

**Ohgaki H**, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 2013;19(4):764-72

**Okada Y**, Hurwitz EE, Esposito JM, Brower MA, Nutt CL, Louis DN. Selection pressures of TP53 mutation and microenvironmental location influence epidermal growth factor receptor gene amplification in human glioblastomas. *Cancer Res.* 2003;63(2):413-6

**Ostrom QT**, Gittleman H, Liao P, Rouse C, Chen Y, Dowling J, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan J. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2007-2011. *Neuro Oncol.* 2014;16 Suppl 4:iv1-iv63

**Ozawa T**, Riester M, Cheng YK, Huse JT, Squatrito M, Helmy K, Charles N, Michor F, Holland EC. Most human non-GCIMP glioblastoma subtypes evolve from a common proneural-like precursor glioma. *Cancer Cell.* 2014;26(2):288-300

**P**

**Paez JG**, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science.* 2004;304(5676):1497-500

**Parsons DW**, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, Diaz LA Jr, Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie SK, Shinjo SM, Yan

H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*. 2008;321(5897):1807-12

**Patel AP**, Tirosh I, Trombetta JJ, Shalek AK, Gillespie SM, Wakimoto H, Cahill DP, Nahed BV, Curry WT, Martuza RL, Louis DN, Rozenblatt-Rosen O, Suvà ML, Regev A, Bernstein BE. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science*. 2014;344(6190):1396-401

**Patil CG**, Yi A, Elramsisy A, Hu J, Mukherjee D, Irvin DK, Yu JS, Bannykh SI, Black KL, Nuño M. Prognosis of patients with multifocal glioblastoma: a case-control study. *J Neurosurg*. 2012;117(4):705-11

**Paugh BS**, Qu C, Jones C, Liu Z, Adamowicz-Brice M, Zhang J, Bax DA, Coyle B, Barrow J, Hargrave D, Lowe J, Gajjar A, Zhao W, Broniscer A, Ellison DW, Grundy RG, Baker SJ. Integrated molecular genetic profiling of pediatric high-grade gliomas reveals key differences with the adult disease. *J Clin Oncol*. 2010;28(18):3061-8

**Perry A**, Aldape KD, George DH, Burger PC. Small cell astrocytoma: an aggressive variant that is clinicopathologically and genetically distinct from anaplastic oligodendroglioma. *Cancer*. 2004;101(10):2318-26

**Perry A**, Brat DJ. *Practical Surgical Neuropathology: a diagnostic approach*. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone, Elsevier, 2010

**Petitjean A**, Achatz MI, Borresen-Dale AL, Hainaut P, Olivier M. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene*. 2007;26(15):2157-65

**Phillips HS**, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, Misra A, Nigro JM, Colman H, Soroceanu L, Williams PM, Modrusan Z, Feuerstein BG, Aldape K. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell*. 2006;9(3):157-73

**Phillips JJ**, Aranda D, Ellison DW, Judkins AR, Croul SE, Brat DJ, Ligon KL, Horbinski C, Venneti S, Zadeh G, Santi M, Zhou S, Appin CL, Sioletic S, Sullivan LM, Martinez-Lage M, Robinson AE, Yong WH, Cloughesy T, Lai A, Phillips HS, Marshall R, Mueller S, Haas-

Kogan DA, Molinaro AM, Perry A. PDGFRA amplification is common in pediatric and adult high-grade astrocytomas and identifies a poor prognostic group in IDH1 mutant glioblastoma. *Brain Pathol.* 2013;23(5):565-73

**Pope WB**, Djoukhadar I, Jackson A. Neuroimaging. *Handb Clin Neurol.* 2016;134:27-50

**Popova SN**, Bergqvist M, Dimberg A, Edqvist PH, Ekman S, Hesselager G, Ponten F, Smits A, Sooman L, Alafuzoff I. Subtyping of gliomas of various WHO grades by the application of immunohistochemistry. *Histopathology.* 2014;64(3):365-79

**Preusser M**, Charles Janzer R, Felsberg J, Reifenberger G, Hamou MF, Diserens AC, Stupp R, Gorlia T, Marosi C, Heinzl H, Hainfellner JA, Hegi M. Anti-O6-methylguanine-methyltransferase (MGMT) immunohistochemistry in glioblastoma multiforme: observer variability and lack of association with patient survival impede its use as clinical biomarker. *Brain Pathol.* 2008;18(4):520-32

**Purkait S**, Jha P, Sharma MC, Suri V, Sharma M, Kale SS, Sarkar C. CDKN2A deletion in pediatric versus adult glioblastomas and predictive value of p16 immunohistochemistry. *Neuropathology.* 2013;33(4):405-12

**Purkait S**, Mallick S, Sharma V, Kumar A, Pathak P, Jha P, Biswas A, Julka PK, Gupta D, Suri A, Upadhyay AD, Suri V, Sharma MC, Sarkar C. A simplified approach for molecular classification of glioblastomas (GBMs): experience from a tertiary care center in India. *Brain Tumor Pathol.* 2016;33(3):183-90

## R

**Rich JN**, Reardon DA, Peery T, Dowell JM, Quinn JA, Penne KL, Wikstrand CJ, Van Duyn LB, Dancey JE, McLendon RE, Kao JC, Stenzel TT, Ahmed Rasheed BK, Tourt-Uhlig SE, Herndon JE 2nd, Vredenburgh JJ, Sampson JH, Friedman AH, Bigner DD, Friedman HS. Phase II trial of gefitinib in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol.* 2004;22(1):133-42

**Rich JN**, Hans C, Jones B, Iversen ES, McLendon RE, Rasheed BK, Dobra A, Dressman HK, Bigner DD, Nevins JR, West M. Gene expression profiling and genetic markers in glioblastoma survival. *Cancer Res.* 2005;65(10):4051-8

**Rickman DS**, Bobek MP, Misek DE, Kuick R, Blaivas M, Kurnit DM, Taylor J, Hanash SM. Distinctive molecular profiles of high-grade and low-grade gliomas based on oligonucleotide microarray analysis. *Cancer Res.* 2001;61(18):6885-91

**Rodriguez FJ**, Scheithauer BW, Giannini C, Bryant SC, Jenkins RB. Epithelial and pseudoepithelial differentiation in glioblastoma and gliosarcoma: a comparative morphologic and molecular genetic study. *Cancer.* 2008;113(10):2779-89

**Rohle D**, Popovici-Muller J, Palaskas N, Turcan S, Grommes C, Campos C, Tsoi J, Clark O, Oldrini B, Komisopoulou E, Kunii K, Pedraza A, Schalm S, Silverman L, Miller A, Wang F, Yang H, Chen Y, Kernytsky A, Rosenblum MK, Liu W, Biller SA, Su SM, Brennan CW, Chan TA, Graeber TG, Yen KE, Mellinghoff IK. An inhibitor of mutant IDH1 delays growth and promotes differentiation of glioma cells. *Science.* 2013;340(6132):626-30

## S

**Sahm F**, Capper D, Jeibmann A, Habel A, Paulus W, Troost D, von Deimling A. Addressing diffuse glioma as a systemic brain disease with single-cell analysis. *Arch Neurol.* 2012;69(4):523-6

**Sahm F**, Reuss D, Koelsche C, Capper D, Schittenhelm J, Heim S, Jones DT, Pfister SM, Herold-Mende C, Wick W, Mueller W, Hartmann C, Paulus W, von Deimling A. Farewell to oligoastrocytoma: in situ molecular genetics favor classification as either oligodendroglioma or astrocytoma. *Acta Neuropathol.* 2014;128(4):551-9

**Saito N**, Fu J, Zheng S, Yao J, Wang S, Liu DD, Yuan Y, Sulman EP, Lang FF, Colman H, Verhaak RG, Yung WK, Koul D. A high Notch pathway activation predicts response to γ secretase inhibitors in proneural subtype of glioma tumor-initiating cells. *Stem Cells.* 2014;32(1):301-12

**Saito T**, Hama S, Kajiwara Y, Sugiyama K, Yamasaki F, Arifin MT, Arita K, Kurisu K. Prognosis of cerebellar glioblastomas: correlation between prognosis and immunoreactivity for epidermal growth factor receptor compared with supratentorial glioblastomas. *Anticancer Res.* 2006;26(2B):1351-7

**Sandmann T**, Bourgon R, Garcia J, Li C, Cloughesy T, Chinot OL, Wick W, Nishikawa R, Mason W, Henriksson R, Saran F, Lai A, Moore N, Kharbanda S, Peale F, Hegde P, Abrey LE, Phillips HS, Bais C. Patients with Proneural Glioblastoma May Derive Overall Survival Benefit from the Addition of Bevacizumab to First-Line Radiotherapy and Temozolomide: Retrospective Analysis of the AVAglio Trial. *J Clin Oncol.* 2015;33(25):2735-44

**Schumacher T**, Bunse L, Pusch S, Sahm F, Wiestler B, Quandt J, Menn O, Osswald M, Oezen I, Ott M, Keil M, Balß J, Rauschenbach K, Grabowska AK, Vogler I, Diekmann J, Trautwein N, Eichmüller SB, Okun J, Stevanović S, Riemer AB, Sahin U, Friese MA, Beckhove P, von Deimling A, Wick W, Platten M. A vaccine targeting mutant IDH1 induces antitumour immunity. *Nature.* 2014;512(7514):324-7

**Schuster J**, Lai RK, Recht LD, Reardon DA, Paleologos NA, Groves MD, Mrugala MM, Jensen R, Baehring JM, Sloan A, Archer GE, Bigner DD, Cruickshank S, Green JA, Keler T, Davis TA, Heimberger AB, Sampson JH. A phase II, multicenter trial of rindopepimut (CDX-110) in newly diagnosed glioblastoma: the ACT III study. *Neuro Oncol.* 2015;17(6):854-61

**Schwartzentruber J**, Korshunov A, Liu XY, Jones DT, Pfaff E, Jacob K, Sturm D, Fontebasso AM, Quang DA, Tönjes M, Hovestadt V, Albrecht S, Kool M, Nantel A, Konermann C, Lindroth A, Jäger N, Rausch T, Ryzhova M, Korbel JO, Hielscher T, Hauser P, Garami M, Klekner A, Bogner L, Ebinger M, Schuhmann MU, Scheurlen W, Pekrun A, Frühwald MC, Roggendorf W, Kramm C, Dürken M, Atkinson J, Lepage P, Montpetit A, Zakrzewska M, Zakrzewski K, Liberski PP, Dong Z, Siegel P, Kulozik AE, Zapatka M, Guha A, Malkin D, Felsberg J, Reifenberger G, von Deimling A, Ichimura K, Collins VP, Witt H, Milde T, Witt O, Zhang C, Castelo-Branco P, Lichter P, Faury D, Tabori U, Plass C, Majewski J, Pfister SM, Jabado N. Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature.* 2012;482(7384):226-31

**Shai R**, Shi T, Kremen TJ, Horvath S, Liao LM, Cloughesy TF, Mischel PS, Nelson SF. Gene expression profiling identifies molecular subtypes of gliomas. *Oncogene.* 2003;22(31):4918-23

**Simmons ML**, Lamborn KR, Takahashi M, Chen P, Israel MA, Berger MS, Godfrey T, Nigro J, Prados M, Chang S, Barker FG 2nd, Aldape K. Analysis of complex relationships between age, p53, epidermal growth factor receptor, and survival in glioblastoma patients. *Cancer Res.* 2001;61(3):1122-8

**Smith JS**, Tachibana I, Passe SM, Huntley BK, Borell TJ, Iturria N, O'Fallon JR, Schaefer PL, Scheithauer BW, James CD, Buckner JC, Jenkins RB. PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93(16):1246-56

**Snuderl M**, Fazlollahi L, Le LP, Nitta M, Zhelyazkova BH, Davidson CJ, Akhavanfard S, Cahill DP, Aldape KD, Betensky RA, Louis DN, Iafrate AJ. Mosaic amplification of multiple receptor tyrosine kinase genes in glioblastoma. *Cancer Cell.* 2011;20(6):810-7

**Soini Y**, Niemelä A, Kamel D, Herva R, Bloigu R, Pääkkö P, Vähäkangas K. p53 immunohistochemical positivity as a prognostic marker in intracranial tumours. *APMIS.* 1994;102(10):786-92

**Solomon DA**, Wood MD, Tihan T, Bollen AW, Gupta N, Phillips JJ, Perry A. Diffuse Midline Gliomas with Histone H3-K27M Mutation: A Series of 47 Cases Assessing the Spectrum of Morphologic Variation and Associated Genetic Alterations. *Brain Pathol.* 2016;26(5):569-80

**Sonabend AM**, Bansal M, Guarnieri P, Lei L, Amendolara B, Soderquist C, Leung R, Yun J, Kennedy B, Sisti J, Bruce S, Bruce R, Shakya R, Ludwig T, Rosenfeld S, Sims PA, Bruce JN, Califano A, Canoll P. The transcriptional regulatory network of proneural glioma determines the genetic alterations selected during tumor progression. *Cancer Res.* 2014;74(5):1440-51

**Steed TC**, Treiber JM, Patel K, Ramakrishnan V, Merk A, Smith AR, Carter BS, Dale AM, Chow LM, Chen CC. Differential localization of glioblastoma subtype: implications on glioblastoma pathogenesis. *Oncotarget.* 2016;7(18):24899-907

**Stupp R**, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352(10):987-96

**Stupp R**, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes AA, Gijtenbeek J, Marosi C, Vecht CJ, Mokhtari K, Wesseling P, Villa S, Eisenhauer E, Gorlia T, Weller M, Lacombe D, Cairncross

JG, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumour and Radiation Oncology Groups.; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. 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.* 2009;10(5):459-66

**Stupp R**, Brada M, van den Bent MJ, Tonn JC, Pentheroudakis G; ESMO Guidelines Working Group. High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2014;25 Suppl 3:iii93-101

**Stupp R**, Hegi ME, Gorlia T, Erridge SC, Perry J, Hong YK, Aldape KD, Lhermitte B, Pietsch T, Grujcic D, Steinbach JP, Wick W, Tarnawski R, Nam DH, Hau P, Weyerbrock A, Taphoorn MJ, Shen CC, Rao N, Thurzo L, Herrlinger U, Gupta T, Kortmann RD, Adamska K, McBain C, Brandes AA, Tonn JC, Schnell O, Wiegel T, Kim CY, Nabors LB, Reardon DA, van den Bent MJ, Hicking C, Markivskyy A, Picard M, Weller M; European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC); Canadian Brain Tumor Consortium; CENTRIC study team. Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2014;15(10):1100-8

**Sturm D**, Witt H, Hovestadt V, Khuong-Quang DA, Jones DT, Konermann C, Pfaff E, Tönjes M, Sill M, Bender S, Kool M, Zapatka M, Becker N, Zucknick M, Hielscher T, Liu XY, Fontebasso AM, Ryzhova M, Albrecht S, Jacob K, Wolter M, Ebinger M, Schuhmann MU, van Meter T, Frühwald MC, Hauch H, Pekrun A, Radlwimmer B, Niehues T, von Komorowski G, Dürken M, Kulozik AE, Madden J, Donson A, Foreman NK, Drissi R, Fouladi M, Scheurlen W, von Deimling A, Monoranu C, Roggendorf W, Herold-Mende C, Unterberg A, Kramm CM, Felsberg J, Hartmann C, Wiestler B, Wick W, Milde T, Witt O, Lindroth AM, Schwartzentruber J, Faury D, Fleming A, Zakrzewska M, Liberski PP, Zakrzewski K, Hauser P, Garami M, Klekner A, Bognar L, Morrissy S, Cavalli F, Taylor MD, van Sluis P, Koster J, Versteeg R, Volckmann R, Mikkelsen T, Aldape K, Reifenberger G, Collins VP, Majewski J, Korshunov A, Lichter P, Plass C, Jabado N, Pfister SM. Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. *Cancer Cell.* 2012;22(4):425-37

**Sturm D**, Bender S, Jones DT, Lichter P, Grill J, Becher O, Hawkins C, Majewski J, Jones C, Costello JF, Iavarone A, Aldape K, Brennan CW, Jabado N, Pfister SM. Paediatric and

adult glioblastoma: multiform (epi)genomic culprits emerge. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(2):92-107

**Sugawa N**, Ekstrand AJ, James CD, Collins VP. Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(21):8602-6

**Suzuki H**, Aoki K, Chiba K, Sato Y, Shiozawa Y, Shiraishi Y, Shimamura T, Niida A, Motomura K, Ohka F, Yamamoto T, Tanahashi K, Ranjit M, Wakabayashi T, Yoshizato T, Kataoka K, Yoshida K, Nagata Y, Sato-Otsubo A, Tanaka H, Sanada M, Kondo Y, Nakamura H, Mizoguchi M, Abe T, Muragaki Y, Watanabe R, Ito I, Miyano S, Natsume A, Ogawa S. Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas. *Nat Genet*. 2015;47(5):458-68

## T

**Takami H**, Yoshida A, Fukushima S, Arita H, Matsushita Y, Nakamura T, Ohno M, Miyakita Y, Shibui S, Narita Y, Ichimura K. Revisiting TP53 Mutations and Immunohistochemistry--A Comparative Study in 157 Diffuse Gliomas. *Brain Pathol*. 2015;25(3):256-65

**Tanboon J**, Williams EA, Louis DN. The Diagnostic Use of Immunohistochemical Surrogates for Signature Molecular Genetic Alterations in Gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2016;75(1):4-18

**(TCGA)** Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*. 2008;455(7216):1061-8

**(TCGA)** Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *N Engl J Med*. 2015 ;372(26):2481-98

**Thomas RP**, Xu LW, Lober RM, Li G, Nagpal S. The incidence and significance of multiple lesions in glioblastoma. *J Neurooncol*. 2013;112(1):91-7

**Thuy MN**, Kam JK, Lee GC, Tao PL, Ling DQ, Cheng M, Goh SK, Papachristos AJ, Shukla L, Wall KL, Smoll NR, Jones JJ, Gikenye N, Soh B, Moffat B, Johnson N, Drummond KJ. A

novel literature-based approach to identify genetic and molecular predictors of survival in glioblastoma multiforme: Analysis of 14,678 patients using systematic review and meta-analytical tools. *J Clin Neurosci*. 2015;22(5):785-99

## V

**Van den Bent MJ**, Carpentier AF, Brandes AA, Sanson M, Taphoorn MJ, Bernsen HJ, Frenay M, Tijssen CC, Grisold W, Sipos L, Haaxma-Reiche H, Kros JM, van Kouwenhoven MC, Vecht CJ, Allgeier A, Lacombe D, Gorlia T. Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine improves progression-free survival but not overall survival in newly diagnosed anaplastic oligodendrogliomas and oligoastrocytomas: a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer phase III trial. *J Clin Oncol*. 2006;24(18):2715-22

**Verhaak RG**, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O'Kelly M, Tamayo P, Weir BA, Gabriel S, Winckler W, Gupta S, Jakkula L, Feiler HS, Hodgson JG, James CD, Sarkaria JN, Brennan C, Kahn A, Spellman PT, Wilson RK, Speed TP, Gray JW, Meyerson M, Getz G, Perou CM, Hayes DN; Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. 2010;17(1):98-110

**Vinagre J**, Almeida A, Pópulo H, Batista R, Lyra J, Pinto V, Coelho R, Celestino R, Prazeres H, Lima L, Melo M, da Rocha AG, Preto A, Castro P, Castro L, Pardal F, Lopes JM, Santos LL, Reis RM, Cameselle-Teijeiro J, Sobrinho-Simões M, Lima J, Máximo V, Soares P. Frequency of TERT promoter mutations in human cancers. *Nat Commun*. 2013;4:2185

## W

**Waitkus MS**, Diplas BH, Yan H. Isocitrate dehydrogenase mutations in gliomas. *Neuro Oncol*. 2016;18(1):16-26

**Watanabe K**, Sato K, Biernat W, Tachibana O, von Ammon K, Ogata N, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Incidence and timing of p53 mutations during astrocytoma progression in patients with multiple biopsies. *Clin Cancer Res*. 1997;3(4):523-30

**Weller M**, Stupp R, Reifenberger G, Brandes AA, van den Bent MJ, Wick W, Hegi ME. MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nat Rev Neurol*. 2010;6(1):39-51

**Weller M**, Stupp R, Hegi ME, van den Bent M, Tonn JC, Sanson M, Wick W, Reifenberger G. Personalized care in neuro-oncology coming of age: why we need MGMT and 1p/19q testing for malignant glioma patients in clinical practice. *Neuro Oncol*. 2012;14 Suppl 4:iv100-8

**Weller M**, van den Bent M, Hopkins K, Tonn JC, Stupp R, Falini A, Cohen-Jonathan-Moyal E, Frappaz D, Henriksson R, Balana C, Chinot O, Ram Z, Reifenberger G, Soffietti R, Wick W; European Association for Neuro-Oncology (EANO) Task Force on Malignant Glioma. EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma. *Lancet Oncol*. 2014;15(9):e395-403

**Wen PY**, Macdonald DR, Reardon DA, Cloughesy TF, Sorensen AG, Galanis E, Degroot J, Wick W, Gilbert MR, Lassman AB, Tsien C, Mikkelsen T, Wong ET, Chamberlain MC, Stupp R, Lamborn KR, Vogelbaum MA, van den Bent MJ, Chang SM. Updated response assessment criteria for high-grade gliomas: response assessment in neuro-oncology working group. *J Clin Oncol*. 2010;28(11):1963-72

**Wesseling P**, Kros JM, Jeuken JWM. The pathological diagnosis of diffuse gliomas: towards a smart synthesis of microscopic and molecular information in a multidisciplinary context. *Diagnostic Histopathology* 2011; 17:11

**Wick W**, Meisner C, Hentschel B, Platten M, Schilling A, Wiestler B, Sabel MC, Wiencke JK, Zheng S, Jelluma N, Tihan T, Vandenberg S, Tamgüney T, Baumber R, Parsons R, Lamborn KR, Berger MS, Wrensch MR, Haas-Kogan DA, Stokoe D. Methylation of the PTEN promoter defines low-grade gliomas and secondary glioblastoma. *Neuro Oncol*. 2007;9(3):271-9

**Wick W**, Hartmann C, Engel C, Stoffels M, Felsberg J, Stockhammer F, Sabel MC, Koeppen S, Ketter R, Meyermann R, Rapp M, Meisner C, Kortmann RD, Pietsch T, Wiestler OD, Ernemann U, Bamberg M, Reifenberger G, von Deimling A, Weller M. NOA-04 randomized phase III trial of sequential radiochemotherapy of anaplastic glioma with procarbazine, lomustine, and vincristine or temozolomide. *J Clin Oncol*. 2009;27(35):5874-80

**Wick W**, Meisner C, Hentschel B, Platten M, Schilling A, Wiestler B, Sabel MC, Koeppen S, Ketter R, Weiler M, Tabatabai G, von Deimling A, Gramatzki D, Westphal M, Schackert G, Loeffler M, Simon M, Reifenberger G, Weller M. Prognostic or predictive value of MGMT promoter methylation in gliomas depends on IDH1 mutation. *Neurology*. 2013;81(17):1515-22

**Wiencke JK**, Zheng S, Jelluma N, Tihan T, Vandenberg S, Tamgüney T, Baumber R, Parsons R, Lamborn KR, Berger MS, Wrensch MR, Haas-Kogan DA, Stokoe D. Methylation of the PTEN promoter defines low-grade gliomas and secondary glioblastoma. *Neuro Oncol*. 2007;9(3):271-9

**Wiestler B**, Capper D, Holland-Letz T, Korshunov A, von Deimling A, Pfister SM, Platten M, Weller M, Wick W. ATRX loss refines the classification of anaplastic gliomas and identifies a subgroup of IDH mutant astrocytic tumors with better prognosis. *Acta Neuropathol*. 2013 Sep;126(3):443-51

**Wikstrand CJ**, Hale LP, Batra SK, Hill ML, Humphrey PA, Kurpad SN, McLendon RE, Moscatello D, Pegram CN, Reist CJ, et al. Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas. *Cancer Res*. 1995;55(14):3140-8

**Wirsching HG**, Weller M. The Role of Molecular Diagnostics in the Management of Patients with Gliomas. *Curr Treat Options Oncol*. 2016;17(10):51

## Y

**Yan H**, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins GJ, Friedman H, Friedman A, Reardon D, Herndon J, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B, Bigner DD. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med*. 2009;360(8):765-73

**Yaziji H**, Massarani-Wafai R, Gujrati M, Kuhns JG, Martin AW, Parker JC Jr. Role of p53 immunohistochemistry in differentiating reactive gliosis from malignant astrocytic lesions. *Am J Surg Pathol*. 1996;20(9):1086-90

**Z**

**Zheng S**, Chheda MG, Verhaak RG. Studying a complex tumor: potential and pitfalls. *Cancer J.* 2012;18(1):107-14



## ***VIII. Agradecimientos***



Este es uno de los apartados del trabajo que requieren más atención. No me gustaría olvidar a ninguna de tantas y tantas personas que han contribuido a él de manera directa o indirecta.

Doy las gracias, en primer lugar, a **Aurelio Ariza**, mi jefe de Servicio, director de mi tesis y mi mentor. Sin su insistencia tanto él como yo sabemos que jamás hubiera acabado este trabajo y jamás lo habría leído. Gracias, Aurelio, por todo lo que me has enseñado sobre la neuropatología, la patología en general y sobre el mundo. Y por enseñarme la “coma de Oxford”, aunque creo que aún no la he entendido...

A **Carmen Balañá**, mucho más que mi compañera oncóloga y directora de tesis, por tu energía y estimulación constante. ¡Trabajar a tu lado es una de las mejores cosas que me ha pasado en este hospital! A **Salvador Villà**, mi tercer director de tesis, por tu sinceridad y tu visión práctica de la medicina, tan aleccionadora. Gracias, también, a todo el equipo del **Comité de tumores del sistema nervioso central** por tantas horas de docencia compartida.

A **Ana** y **Carol**, mis dos “vecinas”, bióloga y bioquímica, por este y otros muchos momentos, siempre tan dispuestas a colaborar y siempre con ese trato tan afectuoso, a pesar de la presión de estos últimos días.

A **José María Velarde**, mi estadístico favorito, sin el cual no habría sabido interpretar mis resultados y no entendería ¡qué diablos es un *consensus clustering*!

A **Maite** y a **Eva**, mis compañeras patólogas y amigas del alma que me han impulsado a tener más inquietudes profesionales que las del mero diagnóstico. ¡Me habéis “abandonado” y no sé si os lo perdonaré algún día!

A todo el **Servicio de Anatomía Patológica de Can Ruti**, en especial a las “chicas inmuno”, **Montse** y **Ángeles**, y la troupe del laboratorio, por vuestra colaboración desinteresada. A mis compañeros patólogos, adjuntos y residentes, porque han aguantado mis idas y venidas de estos últimos meses y mi mal humor. A todos, mil gracias una y otra vez.

Al Servicio de **Anatomía Patológica del Hospital de Mar**, o al menos a los que lo integraron durante los años de mi residencia, porque me reafirmaron en mi convicción de ser patóloga.

## Agradecimientos

A **Francesc Alameda** y a **Teresa Ribalta** por su colaboración en este trabajo, y por responder tan rápido a mis llamadas de auxilio cuando tengo un favor urgente que pedirles.

Quiero agradecer a todos mis compañeros del **Petit Neurocomité** la ilusión con que alimentan el campo de la Neuropatología catalana, un hijo pequeño y, en ocasiones, olvidado de la anatomía patológica pero tan maravillosamente fascinante.

A **Bernat Romaní** y a **Antonio Torralba**, mis amigos, que me han ayudado con mi incapacidad para entender los ordenadores y los procesos matemáticos.

A nuestra querida **Elenita**, una pieza fundamental en mi casa: gracias por cuidar de los que más quiero mientras yo no he tenido el suficiente tiempo para dedicarles. Y a **Merche** por todas las horas de *orthographe*, *lecture* y *autodicte*, ¡y por las que te quedan!

A mi familia, en especial a mis **padres** y **hermana**, por ese apoyo incondicional que siempre está ahí, haga lo que haga y decida lo que decida.

Y a **Jose**, mi marido, no sólo por la ayuda técnica con este documento, sino también por su “gran paciencia”. Gracias por creer siempre que soy la mejor y que puedo hacer lo que me proponga. Y gracias por haberme dado lo más grande que tenemos: a **Mateo**.

