

Actividad de la vía PI3K-AKT-FOXO-p27 como factor pronóstico en tumores astrocitarios

AUTOR: Irene Braña García.

Servicio de Oncología Médica Hospital Vall d'Hebron

DIRECTOR: Joan Seoane Suárez

Director Grupo de Investigación de Expresión Génica y Cáncer. Vall d'Hebron
Instituto de Oncología. ICREA

Departamento de Bioquímica i de Biologia Molecular. Àrea de Bioquímica i de
Biologia Molecular

CO-DIRECTOR: Josep M^a Suriñach Caralt

Departamento de Medicina Interna Hospital Vall d'Hebron, Universidad Autónoma
de Barcelona.

Trabajo de Investigación-Suficiencia investigadora
Curso 2009-2010, Convocatoria de Junio.

CERTIFICAT DEL DIRECTOR I CO-DIRECTOR DEL TREBALL DE RECERCA

Joan Seoane Suárez, Departament de Bioquímica i de Biologia Molecular
Àrea de Bioquímica i de Biologia Molecular,

Josep M^a Suriñach Caralt del Departament de Medicina de la Universitat Autònoma de
Barcelona,

FAN CONSTAR,

que el treball titulat "**Actividad de la vía PI3K-AKT-FOXO-p27 como factor pronóstico en tumores astrocitarios**" ha estat realitzat sota la nostra direcció pel llicenciat **Irene Braña García**, trobant-se en condicions de poder ser presentat com a treball d'investigació de 12 crèdits, dins el programa de doctorat en Medicina Interna/Diagnòstic per la Imatge (curs 2009-2010), a la convocatòria de juny.

Barcelona, 31 de Maig de dos mil deu.

Joan Seoane Suárez
Director del Treball de Recerca

Josep M^a Suriñach Caralt
Co-director del Treball de Recerca

ÍNDICE

Índice	5
Resumen.....	7
Introducción.....	9
Tumores astrocitarios	9
Factores pronóstico en tumores astrocitarios	13
Tratamiento	15
Vías de señalización en tumores astrocitarios.....	16
La vía de señalización PI3K	17
La vía de PI3K en glioblastoma: situación actual	21
Material y Métodos	23
Hipótesis de trabajo y objetivos	23
Selección de pacientes y recogida de datos.....	23
“Tissue microarray”	24
Inmunohistoquímica.....	24
Análisis estadístico	25
Resultados	26
Características de los pacientes	26
Supervivencia libre de progresión	27
Discusión.....	28
Conclusiones.....	30
Bibliografía	31
Material Suplementario	35
Anexo 1. Clasificación de Tumores de Sistema Nervioso Central de la Organización Mundial de la Salud. Cuarta edición.....	35

Anexo 2. Grado tumoral Clasificación de Tumores del Sistema Nervioso Central de la Organización Mundial de la Salud.	37
Anexo 3. Índice de Karnofsky	38
Anexo 4. Criterios de McDonald	39
Tabla 1. Características de los pacientes	40
Tabla 2. Análisis supervivencia libre de progresión	42
Figura 1. Supervivencia libre de progresión	43
Indice de abreviaturas	44
Agradecimientos	46

RESUMEN

Los tumores astrocitarios son entidades poco frecuentes. El pronóstico de los pacientes afectos de glioblastoma y de los tumores astrocitarios que evolucionan a glioblastoma es pobre. Existen pocos factores pronósticos en estos tumores y menos factores predictivos de respuesta a tratamiento.

Recientemente se han descrito las principales vías de señalización implicadas en glioblastoma, siendo PI3K una de ellas. El objetivo de este estudio es valorar la posible correlación entre la supervivencia libre de progresión de una serie de pacientes intervenidos por tumores astrocitarios en nuestro centro y la activación de la vía de PI3K definida mediante la expresión inmunohistoquímica de algunos de sus componentes.

Se analizaron un total de 83 pacientes (55 glioblastomas, 13 astrocitoma anaplásico y 13 astrocitoma difuso, 2 astrocitomas de bajo grado no definidos). Además de los factores correlacionados en la literatura con la supervivencia libre de progresión (grado, cirugía microscópicamente completa y edad), el estudio muestra una correlación directamente proporcional con los niveles de pFOXO e inversamente proporcional con p27, que concuerda con nuestra hipótesis de una mayor agresividad en los tumores con mayor activación de la vía PI3K. El posible valor pronóstico de estos hallazgos deberá ser validado en estudios posteriores. La evidencia de activación de la vía de PI3K en tumores astrocitarios hace que los inhibidores de esta vía puedan convertirse en un interesante abordaje terapéutico. El grado de activación de la vía, medido por la expresión de pFOXO y p27, podría influir en la respuesta, lo que debería tenerse en cuenta como análisis exploratorio en futuros ensayos clínicos.

INTRODUCCIÓN

Tumores astrocitarios

La incidencia anual de tumores del Sistema Nervioso Central (SNC) intracraneales es de 10 a 17 casos por cada 100000 habitantes. De este número aproximadamente el 50% tumores primarios del SNC y el 50% restante metástasis de tumores extracraneales [1].

La cuarta edición de la Clasificación de los Tumores de SNC de la Organización Mundial de la Salud (OMS) los tumores de SNC (Anexo 1) divide los tumores de SNC en función de su probable histogénesis en: tumores de estirpe neuro-epitelial, tumores originados en los nervios craneales y paraespinales, tumores originados en las meninges, linfomas y neoplasias hematopoyéticas, tumores germinales, tumores de la región selar y tumores metastáticos [2]. Además de la clasificación atendiendo a su histogénesis, cada tumor tiene un grado histológico (Anexo 2). El grado tumoral (I, II, III y IV) refleja la agresividad del tumor, de esta manera los tumores de mayor grado (III y IV) tienen un curso clínico más agresivo que los tumores de la misma estirpe de menor grado.

Los tumores de estirpe neuro-epitelial se dividen en tumores astrocitarios, tumores oligodendrocitarios, tumores oligoastrocitarios, tumores endimarios, tumores neuronales y de origen mixto neuronal-glial, tumores de la región pineal, tumores embrionarios y otros tumores neuro-epiteliales.

Los tumores astrocitarios provienen de los astrocitos. Los astrocitos forman parte de las células de la glia, tienen su origen en el neuroectodermo y se encuentran tanto en sustancia gris (astrocitos protoplásmicos), como en sustancia blanca (astrocitos fibrilares). Su nombre es debido a su morfología estrellada. Participan en funciones nutrición celular, aislante eléctrico en las sinapsis, participan en la barrera hematoencefálica y son las principales células responsables de la reparación y formación de cicatrices en el cerebro [1].

De acuerdo con la clasificación de la OMS los tumores astrocitarios se dividen en [2]:

- Astrocitomas pilocítico
- Astrocitoma subependimario
- Xantastrocitoma pleomórfico
- Astrocitoma difuso
- Astrocitoma anaplásico
- Gliomatosis cerebri
- Glioblastoma

Astrocitoma pilocítico

El astrocitoma pilocítico es un astrocitoma relativamente circunscrito, de lento crecimiento y a menudo quístico. Constituye un 5-6% de global de los gliomas con una incidencia global de 0.37 casos cada 100000 habitantes-año. Suele presentarse en niños y adultos jóvenes, siendo en este grupo de edad el glioma más frecuente: 21% del total de tumores de SNC entre 0 y 14 años y 16% del total de tumores de SNC entre 15 y 19 años [3].

Histológicamente se caracteriza por un patrón bifásico con una proporción variable de células bipolares compactas asociadas a fibras de Rosenthal y células multipolares laxas con microquistes y cuerpos granulares eosinofílicas [2]. Se localizan generalmente en cerebelo, aunque pueden aparecer en el suelo y pared de tercer ventrículo y los nervio óptico. Su presencia en los hemisferios cerebrales es excepcional [1]. Se considera tumor de grado I de la OMS [2].

Como tumor relacionado al astrocitoma pilocítico se describe el astrocitoma pilomixoide que presenta una prominente matriz mucosa y un agrupamiento angiocéntrico de células bipolares monomorfas sin fibras de Rosenthal ni cuerpos granulares eosinofílicos [2].

Astrocitoma subependimario de células gigantes

Es un tumor benigno, de lento crecimiento, proveniente de la pared lateral de los ventrículos. Está compuesto por células ganglioides gigantes. Se asocia a la esclerosis tuberosa, siendo el tumor característico en pacientes con dicha afección. Son tumores de grado I de la OMS [2].

Xantastrocitoma pleomórfico

Es un tumor astrocitario con pronóstico relativamente favorable que afecta típicamente a niños y adultos jóvenes: dos tercios de los pacientes tienen menos de 18 años.

Constituye menos del 1% de los tumores astrocitarios. Se localiza en la superficie de los hemisferios cerebrales y frecuentemente afecta a las meninges. Entre sus características histológicas destaca la presencia de células pleomórficas lipidizadas que expresan proteína fibrilar glial ácida (GFAP) y frecuentemente se encuentran rodeados por una red de fibrina y presentan cuerpos granulares eosinofílicos. Son tumores grado II de la OMS [2].

Astrocitoma difuso

Se caracteriza por ser presentar infiltración difusa del SNC, corresponde a un tumor grado II de la OMS. A pesar de ser un tumor con un alto grado de diferenciación celular y crecimiento lento, tiende a progresar a astrocitoma anaplásico y finalmente a glioblastoma [2]. La mediana de supervivencia tras la intervención quirúrgica es de 6 a 8 años [2].

Representa un 10-15% de los tumores de SNC de estirpe astrocitaria, con una incidencia de 1.4 casos cada millón de habitantes-año [2]. Típicamente afecta a adultos jóvenes, presentando un pico de incidencia entre los 30 y 40 años [2].

Puede presentarse en cualquier localización del SNC, pero preferentemente la localización es supratentorial [2].

Atendiendo al tipo de célula predominante se describe tres variantes: astrocitoma fibrilar, astrocitoma gemistocítico y astrocitoma protoplásmico. El astrocitoma fibrilar es la variante más frecuente y se caracteriza por estar compuesto principalmente de astrocitos neoplásicos fibrilares. El astrocitoma gemistocítico se caracteriza por presentar al menos un 20% de gemistocitos (astrocitos con núcleo aumentado de tamaño, con citoplasma abundante eosinófilo en torno a un núcleo excéntrico y que presenta numerosas prolongaciones ramificadas). Tiene una especial tendencia a progresar a astrocitoma anaplásico y glioblastoma. El astrocitoma protoplásmico es una

variante rara, caracterizada por la presencia de astrocitos neoplásicos con cuerpo celular pequeño, prolongaciones nerviosas cortas y escasa expresión de GFAP.

Astrocitoma anaplásico.

Se trata de un astrocitoma con infiltración difusa que afecta principalmente a adultos, localizado en hemisferios cerebrales y que se caracteriza por atipia nuclear, aumento de la celularidad y una significativa actividad proliferativa. El tumor puede provenir de astrocitomas difusos (grado II de la OMS) o tener un origen *de novo*.

Representa un 5-10% de los tumores astrocitarios, la edad media de presentación oscila entre los 45-50 años [3,4]. Se localiza principalmente en los hemisferios cerebrales.

Su evolución natural es a progresar a glioblastoma, con un intervalo medio de progresión de dos años. Es un tumor grado III de la OMS [2].

Glioblastoma

Es el tumor primario cerebral más frecuente, correspondiendo a un 12-15% de los tumores intracraneales y al 60-75% de los tumores astrocitarios [2,4]. Su incidencia se estima entre 3-4 casos nuevos por 100000 habitantes-año [3,4]. Se puede presentar a cualquier edad, aunque lo hace principalmente en adultos, con una edad media de presentación de 61 años [4].

Se trata del tumor de mayor agresividad dentro de los que presentan predominantemente diferenciación astrocitaria y se caracteriza por presentar como hallazgos histopatológicos: atipia nuclear, pleomorfismo nuclear, actividad mitótica elevada, trombosis vascular, proliferación vascular y necrosis. Por todo ello es un tumor grado IV de la OMS [2].

Se localiza principalmente en hemisferios cerebrales: lóbulo temporal (31%), lóbulo parietal (24%), lóbulo frontal (23%) y lóbulo occipital (16%). La afectación simultánea de lóbulo frontal y parietal es frecuente [2,4]. La afectación de ganglios de la base y tronco del encéfalo es poco frecuente y en general se presenta en niños. La afectación de cerebelo o médula espinal es excepcional [2,4]. Habitualmente son unifocales (95-97%), aunque un 2.5-5% son multifocales [2,5].

En cuanto a su origen más del 90% son glioblastomas primarios (originados *de novo*) y menos del 10% son glioblastomas secundarios (proviene de la progresión desde astrocitoma difuso o astrocitoma anaplásico) [6,7]. El tiempo de progresión desde astrocitoma difuso (grado II de la OMS) a glioblastoma es muy variable (rango 1-10 años), siendo la mediana de 4-5 años [4,8]. En un estudio poblacional realizado en Zurich entre 1980 y 1984 la mediana de supervivencia se encontraba en 4.6 meses, sólo un 17.7% estaban vivos al año tras el diagnóstico y sólo un 3.3% estaban vivos en el segundo año [6]. Esta se trata de una serie en la que una escasa proporción de los pacientes recibía tratamiento complementario. La mediana de supervivencia en este estudio es inferior a la presentada por *Stupp et al* (12.1 meses con radioterapia y 14.6 meses con quimioterapia y radioterapia).

Factores pronóstico en tumores astrocitarios

Astrocitoma difuso

Factores clínicos

Como factores de pronóstico favorable se encuentran la menor edad de presentación [9,10], la resección macroscópicamente completa [11,12] y el que el primer síntoma haya sido una crisis comicial [12].

En cambio el mayor tamaño tumoral al diagnóstico [13] o el debut clínico con un déficit neurológico [2] se han asociado a un peor pronóstico.

Índice de proliferación

Existe una correlación entre la evolución clínica y el valor del Ki-67: un valor por encima de 5% se asocia a una menor supervivencia [14].

Factores histopatológicos

La presencia de gemistocitos en una mayor proporción se asocia a una progresión más rápida que los astrocitomas difusos con componente exclusivamente fibrilar [9, 11].

Alteraciones genéticas

Algunos autores han descrito una asociación entre mutación de *TP53* y menor intervalo a la progresión [8,15].

Astrocitoma anaplásico

Al igual que en el astrocitoma difuso una mayor edad al diagnóstico se correlaciona con peor pronóstico [2]. En un estudio se muestra la asociación de la amplificación de EGFR con un peor pronóstico [16].

Glioblastoma

Factores clínicos

El “Radiation Therapy Oncology Group” (RTOG) analizó la supervivencia de 1578 pacientes con glioma de alto grado en relación a diferentes variables clínicas. La edad fue el factor pronóstico más importante, presentando los pacientes menores de 50 años un mejor pronóstico [17]. La relevancia de la edad como factor pronóstico también quedó reflejada en el estudio poblacional publicado por *Ohgaki* [6].

Otro factor clínico importante es el estado general del paciente. Se objetivó como factor pronóstico favorable el índice de *Karnofsky* (Anexo 3) mayor de 70% [17].

Factores histopatológicos

La presencia y extensión de la necrosis se correlaciona inversamente con la menor supervivencia [18,19]

Alteraciones genéticas

La pérdida de heterocigosidad del cromosoma 10 (“Loss of heterozygosity” LOH10) se ha asociado a menor supervivencia [6]. Existen resultados contradictorios sobre el papel pronóstico de la mutación de *TP53* [6], tampoco se ha descrito que la amplificación de *EGFR* o la mutación de *PTEN* tengan un claro factor pronóstico [6].

Biomarcadores

YKL-40 (“chitinase-3-like-1”) es una proteína secretada de función desconocida, que se sobreexpresa en glioblastoma [20]. Su expresión está asociada a LOH 10q, peor respuesta a la radioterapia, menor tiempo a la progresión y menor supervivencia [21].

Tratamiento

Tumores astrocitarios de bajo grado

El tratamiento principal es la cirugía, cuanto más amplia sea mayor es la supervivencia global y libre de enfermedad [22].

En astrocitomas grado I la resección completa obtiene tasas de supervivencia libre de progresión y global cercanas al 100%; en cambio en pacientes con resección parcial la supervivencia libre de progresión es de 30-40%. En el estudio de *Kidd et al* [23] la radioterapia postoperatoria comparada con la radioterapia diferida mejora la supervivencia libre de progresión.

En los astrocitomas grado II el estudio de *Van de Bent et al* mostró que aunque la radioterapia no previene la transformación a alto grado, aunque la radioterapia precoz aumenta la supervivencia libre de progresión [24].

Astrocitoma anaplásico

El tratamiento consiste en la máxima resección quirúrgica seguida de radioterapia [25]. El papel de la quimioterapia continua siendo controvertido, aunque el meta-análisis publicado por *Stewart et al* [26] muestra un beneficio del 6% en la supervivencia a 1 y 2 años. Actualmente está en curso un ensayo fase III para valorar el papel de temozolomida.

Glioblastoma

El tratamiento del glioblastoma es un tratamiento multidisciplinar que combina cirugía, radioterapia y quimioterapia. La ausencia de tumor residual en las pruebas de imagen post-operatorias se correlaciona con una mejor supervivencia global [27]. Un estudio fase III mostró la superioridad del tratamiento complementario de radioterapia concomitante con temozolomida y seis ciclos posteriores de temozolomida comparado con el tratamiento únicamente con radioterapia, alcanzando una mediana de supervivencia de 14.6 meses [28].

Como factores predictivos de respuesta se han descrito la edad, el estado general del paciente y la metilación del promotor de *MGMT*. Esta última aumenta la sensibilidad al tratamiento con temozolomida lo que conlleva una mayor mediana de supervivencia global (18.2 meses) respecto a los que no presentan la metilación del promotor (12.2 meses) [29].

Vías de señalización en tumores astrocitarios

El proyecto “The Cancer Genome Atlas” (TCGA) tiene como objetivo el análisis multidimensional a gran escala de las alteraciones moleculares de los diferentes tumores. En 2008 se publicó el resultado del análisis de número de copias de DNA, expresión génica y metilación de DNA de 206 glioblastomas [30]. En dicho estudio se identificaba que las alteraciones genéticas encontradas en los glioblastomas podían agruparse en tres vías (Figura 1):

- Vía de receptores tirosina-kinasa (RTK) / RAS / PI3K
- Vía de p53
- Vía de RB (gen del retinoblastoma)

Las vías de los factores de crecimiento (RTK/RAS/PI3K) están activadas en un 88% de los glioblastomas, bien por sobreexpresión o amplificación de los genes de los RTK (*EGFR*, *ERBB2*, *PDGFRA*, *MET*), por mutaciones puntuales que permiten la transmisión de señal sin necesidad de que se una ligando (como el receptor *EGFRvIII*), por mutaciones en proteínas intracelulares implicadas en la vía que pueden ser activadoras (como *PIK3A* o *PIK3R1*) o que hagan perder la función a un gen supresor (como *PTEN*).

La vía supresora de p53 activa la transcripción de p21, una molécula que bloquea el ciclo celular en fase G1 e induce apoptosis o senescencia. Esta vía se encuentra alterada en 87% de los glioblastomas.

La vía de RB se encuentra alterada en el 78% de los casos. Se trata de una vía supresora que impide a la célula entrar en fase S del ciclo celular inactivando la familia de factores de transcripción E2F.

Recientemente se ha publicado una clasificación de los glioblastomas basándose en su perfil de expresión génica (Figura 2) [31]:

- Subtipo clásico: presentan ganancia del cromosoma 7 y pérdida del cromosoma 10 y pérdida focal del cromosoma 9. Estos cambios se traducen en amplificación de *EGFR* y pérdida de *PTEN* y *CDKN2A*. Presentan activación de las vías de Notch y Sonic hedgehog. Mantienen indemne *TP53* lo que justifica su sensibilidad a la radioterapia.

- Subtipo mesenquimal: presenta sobreexpresión de los genes *CHI3L1*, *MET* y genes de la superfamilia *TNF* y de la vía NFκB. Presenta frecuentemente inactivación de *NF1*, *TP53* y *PTEN*.
- Subtipo proneural: presenta un perfil génico con activación de genes del desarrollo neural, tanto oligodendrocítico (*PDGFRA*, *OLIG2*, *TCF3* y *NKX2-2*) como proneural (*SOX*, *DCX*, *DLL3*, *ASCL1* y *TCF4*). Los pacientes de este grupo son más jóvenes y sus tumores se caracterizan por presentar alteraciones (amplificación o mutación) del *PDGFRA*, mutaciones del gen *IDH1* (30%), *TP53* (54%) y *PIK3CA/PIK3R1* (19%). Presenta amplificación del cromosoma 7 y pérdida del cromosoma 10 con menos frecuencia que el subtipo clásico.
- Subtipo neural: el perfil de expresión génica es similar al del tejido normal. Presenta marcadores neuronales como *NEFL*, *GABRA1*, *SYT1* y *SLC12A5*.

Aún no se han asociado dichos perfiles a factores pronóstico, pero dada la diferente activación de genes, resulta una división prometedora de cara a personalizar el abordaje terapéutico.

La vía de señalización PI3K

La familia de PI3K (“phosphoinositide 3-kinases”) son kinasas de lípidos que tienen un papel clave en múltiples procesos celulares como supervivencia celular, proliferación y diferenciación [32]. Transducen señales que reciben de recetores tirosina-kinasa (RTKs) y de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) generando fosfolípidos que actuarán como mensajeros intracelulares activando a la serin-treonin proteína-kinasa AKT y otros efectores (Figura 3).

La familia de PI3K se divide en tres clases atendiendo a las características estructurales y a la especificidad de sustrato:

- Clase I: están formadas por una subunidad catalítica y una reguladora y son activadas directamente por receptores de la superficie celular.
 - Clase IA: es activada por RTKs, GPCRs y algunos oncogenes como RAS. Está formada por una subunidad catalítica (p110) codificada por el gen *PIK3CA* y una subunidad reguladora (p85) que es codificada por los genes *PIK3R1*, *PIK3R2* y *PIK3R3*. A través del dominio p85 PI3K es reclutada en la membrana celular, bien por interacción directa de p85 con los RTKs o por interacción con proteínas adaptadoras (como IRS1 – insulin receptor substrate 1). La subunidad catalítica genera fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato.
 - Clase IB: es activada exclusivamente por GPCRs. Es un heterodímero formado por una subunidad catalítica p110 γ y una subunidad reguladora p101. Recientemente se han descrito las subunidades p84 y p87 que actúan como proteínas adaptadoras. p110 γ es activada por la interacción directa de p101 con la subunidad G $\beta\gamma$ de las proteínas G triméricas. p110 γ se encuentra principalmente en leucocitos, pero también en células cardíacas, pancreáticas, hepáticas y del músculo esquelético.
- Clase II: presentan una única subunidad catalítica que utiliza como sustrato principalmente fosfatidilinositol o fosfatidilinositol-4-fosfato. Son activadas por RTKs, receptores de citoquinas e integrinas. Su función aún no se ha estudiado por completo.
- Clase III: presenta una única subunidad catalítica (VPS34 “homologue of the yeast vacuolar proteína sorting-associated protein 34”). Solo produce fosfatidilinositol-3-fosfato que es un importante regulador del transporte a través de membrana. Actúa a

través de mTOR (“mammalian target of rapamycin”) regulando el crecimiento celular. También es un regulador de la autofagia.

Como otras proteínas importantes en esta vía de señalización destaca:

- PTEN (“phosphatase and tensin homologue”). Actúa como antagonista de la actividad PI3K dado que convierte el fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato en fosfatidilinositol-4,5-bifosfato. La pérdida de PTEN produce una activación constitutiva de la vía, que participa en la oncogénesis.
- mTOR: pertenece a la superfamilia PI3K (se considera PI3K clase IV). Presenta dos complejos mTORC1 y mTORC2. Están implicados en la regulación del crecimiento y proliferación celular dado que controla la disponibilidad de nutrientes, los niveles celulares de energía, los niveles de oxígeno y las señales mitogénicas.
- AKT: es una serin-treonin proteína-kinasa que presenta tres isoformas (AKT1, AKT2 y AKT3). La activación de AKT comienza con la translocación a la membrana plasmática mediante el anclaje del dominio N-terminal de homología de pleckstrina al fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato. Esto produce un cambio conformacional en AKT que deja expuesto dos aminoácidos cruciales para ser fosforilados. La fosforilación puede ser realizada por la misma AKT o por otras kinasas. La activación de AKT regula a múltiples sustratos [33], que a su vez regulan diversas funciones celulares entre las que destacan (Figura 4):
 - Supervivencia celular: AKT regula diversas proteínas implicadas en la supervivencia celular como BAD a la que inhibe o GSK3 a la que regula negativamente. GSK3 actúa, entre otros niveles, como supresor de la vía pro-apoptótica de Bcl-2. También favorece la translocación de MDM2 lo que aumenta su función regulando negativamente a p53. Por último AKT fosforila el factor de transcripción FOXO produciendo su translocación fuera del núcleo. FOXO regula

la transcripción de genes implicados en la apoptosis, la regulación de ciclo celular y procesos metabólicos.

- Crecimiento celular: AKT activa mTORC1 a través de la fosforilación de PRAS40 (proline-rich AKT substrate 40 kDa) o de TSC2 (tuberous sclerosis 2 protein). La activación de mTORC1 regula S6K1 (ribosomal protein S6 Kinase1) y 4EBP1 (initiation factor 4E-binding protein 1) ambas implicadas en la regulación de la síntesis proteica.
- Proliferación celular: AKT impide que p27 actúe correctamente translocándolo del núcleo al citoplasma; además la expresión de p27 está reducida por la inhibición de FOXO. La función de p21 también está disminuida tanto por la fosforilación directa mediada por AKT que lo inhibe como por la disminución de la expresión dado que p53 (que regula la expresión de p21) está también disminuido (por la activación de MDM2 descrita previamente). Tanto la activación de GSK3 como mTOR están implicada en la regulación del ciclo celular.
- Angiogénesis: AKT favorece la angiogénesis mediante el aumento de producción del factor inducible por hipoxia (HIF) que regula la expresión de diversos factores proangiogénicos. Además, AKT aumenta la producción de óxido nítrico que también tiene capacidad pro-angiogénica.
- Metabolismo celular: AKT regula la captación de glucosa en respuesta a insulina, la fosforilación de la glucosa y el transporte de otros nutrientes a través de la membrana celular.
- Migración celular e invasión

La vía de PI3K en glioblastoma: situación actual

Los hallazgos de TCGA han permitido identificar la activación de la vía de PI3K en glioblastomas a través de los siguientes mecanismos: las mutaciones en el gen que codifica el dominio catalítico de PI3K (*PIK3CA*), las mutaciones en el gen que codifica el dominio regulador de PI3K (*PIK3R1*) (Figura 5), la mutación de *PTEN*, la pérdida de *PTEN*, la amplificación de *AKT* y la mutación de *FOXO* [30].

Atendiendo a la clasificación en subgrupos del glioblastoma en función de la firma de expresión génica [31], la activación de la vía de PI3K es un fenómeno presente en la mayoría de los subtipos (Figura 2).

En el momento actual se desconoce si la activación de PI3K puede constituir un factor pronóstico. El desarrollo de inhibidores de PI3K hace necesario la cuantificación del grado de activación de la vía de PI3K para identificar a aquellos pacientes que se puedan beneficiar más de estos nuevos tratamientos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Hipótesis de trabajo y objetivos

La **hipótesis** del presente trabajo de investigación se basa en que dada el papel de la vía de PI3K en tumores astrocitarios, el grado de activación de la misma puede ser un factor pronóstico.

El **objetivo primario** de este estudio retrospectivo es la correlación de la supervivencia libre de progresión de los pacientes afectos por glioblastoma diagnosticados en nuestro centro con la activación de la vía de PI3K.

Para determinar la activación de la vía PI3K se estudiará la expresión de:

- AKT fosforilado (p-AKT)
- FOXO fosforilado (p-FOXO)
- p21
- p27

Los objetivos secundarios son:

- La correlación de la activación de PI3K mediante la expresión de las proteínas anteriormente descritas con la supervivencia global de los pacientes.
- La descripción de las características clínicas y patológicas de los pacientes, así como la descripción de los tratamientos recibidos.

Selección de pacientes y recogida de datos

Se ha realizado un estudio retrospectivo de aquellos pacientes diagnosticados de un tumores astrocitarios e intervenidos en nuestro centro entre marzo de 2001 a diciembre 2008 de los que se disponía de muestra incluida en parafina adecuada para la realización de los análisis posteriores.

Se recogieron datos epidemiológicos de los pacientes (edad, sexo), datos clínicos (sintomatología al diagnóstico, fecha de diagnóstico, localización de la enfermedad, multicentricidad), diagnóstico patológico atendiendo a la Cuarta Edición de la Clasificación de Tumores de Sistema Nervioso Central de la

Organización Mundial de la Salud (Anexo 1) y datos sobre tipo de cirugía realizada (biopsia, resección parcial o resección completa) y sobre el tratamiento radioterápico y quimioterápico administrado.

Para la definición de supervivencia libre de progresión, se definió progresión atendiendo a los criterios McDonald (Anexo 4).

“Tissue microarray”

Un “tissue microarray” o matriz de tejido consiste en un bloque de parafina en el que se han incluido diferentes cilindros de tejido separados para su posterior análisis simultáneo [34].

Para la construcción del mismo se utiliza un “tissue-arrayer”, que es un instrumento que permite introducir múltiples muestras de tejido en un bloque de parafina. Consta de dos agujas de punción, una para realizar orificios en el bloque receptor y otra para extraer la muestra de los bloques originarios y colocarlo en el orificio previamente creado en el bloque receptor. Para la correcta colocación de los cilindros el “tissue-arrayer” consta de dos micrómetros (para eje X e Y) para definir las coordenadas del array permitiendo un desplazamiento preciso.

Para el estudio se realizó un “tissue microarray” incluyendo tres cilindros de 1mm cada uno de ellos.

Inmunohistoquímica

Para la realización de inmunohistoquímica se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales:

- anti-p21: concentración 1:50; DAKO (Glostrup, Dinamarca), Número de catálogo M7202.
- anti-p27: concentración 1:80; DAKO (Glostrup, Dinamarca), Número de catálogo M7203.
- FOXO 3a: concentración 1:50, Cell Signalling Technology (Boston, Massachusetts), Número de catálogo 9467.

- pFOXO1/3a: concentración 1:25, Cell Signalling Technology (Boston, Massachusetts), Número de catálogo 9464.
- pAKT: concentración 1:20, Cell Signalling Technology (Boston, Massachusetts), Número de catálogo 4060.

El resultado se expresó como un Histological Score (HSCORE). HSCORE es un sistema basado en la suma de la proporción de células teñidas multiplicado por la reactividad de tinción.

HSCORE = (0= porcentaje células con tinción negativo) + (1 x porcentaje de células con tinción débil) + (2 x porcentaje de células con tinción intermedia) + (3 x porcentaje de células con tinción fuerte)

Rango (0-300)

Análisis estadístico

Para el análisis descriptivo

Para el cálculo de la supervivencia libre de progresión se ha realizado una estimación por Kaplan-Meier.

Para el análisis de la correlación entre la supervivencia libre de progresión se ha realizado un análisis de regresión de Cox univariante. Posteriormente se han integrado las variables mediante un análisis de regresión de Cox multivariante.

RESULTADOS

Características de los pacientes

Se han incluido 83 pacientes intervenidos en el Hospital Vall d'Hebron. Las características principales de los pacientes se han incluido en la **Tabla 1**, de ellos 55 presentaban glioblastoma, 13 presentaban astrocitoma anaplásico y 13 presentaban astrocitoma difuso y 2 astrocitomas de bajo grado de diagnóstico no definido.

De los 55 glioblastomas, la edad media de presentación es 58.44 años (rango 23-78 años). El síntoma al diagnóstico más frecuente fue la cefalea (32,7%). Un 18.2% de los tumores eran multicéntricos. En el 48.1% de los casos se realizó resección parcial, en el 33.3% de los casos se realizó resección completa y en el 18.5% se realizó sólo biopsia esterotáctica. El 76.4% de los pacientes recibió radioterapia adyuvante y un 64.5% del total realizó quimioterapia adyuvante con temozolomida, con una media de ciclos recibidos de 4 (rango 0-14).

La edad media de presentación de los 13 pacientes intervenidos de astrocitoma anaplásico fue 45,92 años (rango 28-72). El síntoma más frecuente al diagnóstico fueron las crisis comiciales. En un 38.5% se realizó una resección completa y en un 38.5% una resección parcial. La mayoría de los pacientes recibieron radioterapia inmediata tras la cirugía. Once de los pacientes recibieron además quimioterapia concomitante y adyuvante.

La edad media de los 13 pacientes intervenidos de astrocitoma difuso fue 42 (rango 6-68). La clínica más frecuente de debut fueron las crisis comiciales. En la mayoría de los pacientes se realizó una resección completa (46.2%) y ocho de ellos realizaron radioterapia inmediata tras la cirugía.

Supervivencia libre de progresión

La mediana de seguimiento de la serie fue de 9,4 meses, durante este tiempo 58 pacientes presentaron progresión tras la cirugía (44 glioblastomas, 9 astrocitomas anaplásicos y 5 astrocitomas difusos).

En concordancia con la literatura, la supervivencia libre de progresión en nuestra serie de casos está influenciada de forma estadísticamente significativa con el grado tumoral (en tumores grado IV, HR 4.045, $p=0.002$, Intervalo confianza 95% 1.67-9.79), la edad del paciente (HR 1.033, $p=0.002$, intervalo de confianza del 95% 1.011-1.055) y la realización de resección completa (HR 0.29, $p=0.015$, intervalo de confianza 0.108-0.790). (**Tabla 2**)

En cuanto a la hipótesis de nuestro estudio, pFOXO y p27 mostraron una correlación estadísticamente significativa con la supervivencia libre de progresión (HR_{pFOXO} 1.008, $p=0.002$, intervalo de confianza 95% 1.003-1.013; HR_{p27} 1.004, $p=0.022$, intervalo confianza 95% 0.98-0.99). (**Tabla 2**)

DISCUSIÓN

El glioblastoma y los tumores astrocitarios cuya evolución natural conlleva la progresión a glioblastoma ofrece, hasta el momento actual, un panorama desolador desde el punto de vista clínico, caracterizado por una pobre supervivencia y por los escasos recursos terapéuticos disponibles que han evolucionado poco en las últimas décadas. Por el contrario, la investigación preclínica de estos tumores ha resultado intensamente productiva en los últimos años, hallazgos que podrían empezar a trasladarse en la clínica en años venideros.

Dentro de estos hallazgos destaca el realizado por el proyecto “The Cancer Genome Atlas” [30], en primer lugar, por el hecho de ser el primer tipo tumoral en que se ha realizado y, por otra parte, por la esperada utilidad clínica de los resultados extraídos. Por ser el objeto de análisis en este estudio, destacamos el papel de la activación de la vía de PI3K que se encuentra alterada hasta en el 55% de los tumores teniendo sólo en cuenta las alteraciones de la vía a partir de PI3K incluyendo a éste, pero que alcanzan el 88% cuando se tiene en cuenta la activación de los receptores tirosinkinasa que activan a PI3K. Al dividir glioblastomas en subtipos atendiendo a su firma génica, se observa que la activación de la vía de PI3K se presenta de forma homogénea en todos ellos, aunque el mecanismo de dicha desregulación sea diferente [31]. Esto nos indica que la vía de PI3K puede ser un interesante abordaje terapéutico, aunque paralelamente al desarrollo de estos fármacos en estos tumores, debe aumentarse el conocimiento que tenemos sobre los mecanismos subyacentes a esta activación.

La pregunta que nos planteamos en este estudio es, dado que la activación de la vía de PI3K es un fenómeno frecuente en tumores astrocitarios, si el grado de activación de la misma se correlaciona con una mayor agresividad de estos tumores. Por una parte debido a la escasa información sobre factores pronóstico moleculares en estos tumores que puedan afinar más la información de los factores pronóstico clínicos que disponemos en el momento y por otra parte, para identificar un subgrupo de pacientes que se pueda beneficiar más de los inhibidores de la vía PI3K.

Además, dado que el método utilizado en nuestro estudio es la inmunohistoquímica, esto nos permite cuantificar el grado de expresión de diferentes puntos de la vía de PI3K, evidenciando cuáles son las consecuencias de las alteraciones genéticas previamente descritas [30, 31]. Por otra parte la técnica de inmunohistoquímica es más accesible que las técnicas para el estudio de expresión génica, por lo que la identificación de marcadores mediante inmunohistoquímica, son de particular interés para posteriormente validar el posible valor pronóstico y predictivo de nuestros hallazgos.

Partiendo de un grupo de pacientes cuyas características clínicas son similares a las descritas en la literatura [2-4], además de la correlación con supervivencia libre de progresión de los factores clínico-patológicos ya conocidos (edad, grado histológico y extensión de resección quirúrgica), encontramos una correlación estadísticamente significativa con pFOXO y p27.

El hecho de que un mayor nivel de expresión de pFOXO se correlacione de una forma directamente proporcional con la supervivencia libre de progresión encaja con el hecho de que FOXO es un factor de transcripción regulado por AKT de forma que cuando se activa la vía de PI3K, se produce la fosforilación de FOXO, que produce la salida del mismo del núcleo impidiendo la transcripción de genes fundamentales para apoptosis y regulación del ciclo celular cuya expresión está regulada por FOXO [35-39].

Uno de estos genes es *TP27*, cuya producto de expresión es la proteína p27 o inhibidor de kinasa dependiente de ciclina 1B. Es un importante regulador del ciclo celular dado que inhibe a ciclina E y ciclina A. Esta inhibición produce la parada del ciclo celular en G1 [40-44]. Esto encaja con nuestro hallazgo de una relación inversamente proporcional entre p27 y la supervivencia libre de progresión.

Aunque el valor de estos hallazgos sea limitado, dado la necesidad de validación en posteriores estudios, propone un interesante modelo de mecanismo de actividad de la vía PI3K en tumores astrocitarios que garantiza nuestro continuar nuestro estudio de la misma.

CONCLUSIONES

Las características de los pacientes analizados en este estudio son similares a las presentadas en la literatura.

Como hallazgo relevante, además de los factores correlacionados en la literatura con la supervivencia libre de progresión (grado, cirugía microscópicamente completa y edad), hemos encontrado correlación directamente proporcional con los niveles de pFOXO e inversamente proporcional con p27. Esto encaja con nuestra hipótesis de que una mayor activación de la vía de PI3K (caracterizada por unos mayores niveles de pFOXO) se correlaciona con una peor supervivencia libre de progresión. También viene apoyada con la correlación inversa entre los niveles de p27 y la supervivencia libre de progresión, dado que p27 es un regulador negativo del ciclo celular (es decir favorece la apoptosis) y su expresión está regulada por FOXO no fosforilado (activo). Indicando de forma indirecta que una mayor fosforilación de FOXO debido a la activación de PI3K y que origina menores niveles de p27 se correlaciona con peor supervivencia libre de progresión.

Tras este hallazgo es necesario continuar estudiando el mecanismo subyacente tras la activación de PI3K en tumores astrocitarios. El posible valor de esta correlación deberá ser validado posteriormente; no solo por la posibilidad de encontrar una correlación pronóstica de fácil realización en un grupo de tumores en los que disponemos de pocas herramientas con este fin, sino por la posibilidad de encontrar un posible marcador predictivo de respuesta a los nuevos fármacos inhibidores de la vía de PI3K que están en las primeras fases de desarrollo clínico.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.-Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins Patología estructural y funcional. 6ª edición. Madrid. McGraw-Hill-Interamericana de España S.A.U. 2000.
- 2.-Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK. Editors. WHO classification of tumours of the Central Nervous System. Lyon. International Agency for Research on Cancer. 2007.
- 3.-Central Brain Tumor Registry of the United States (CBTRUS). Statistical Report: Primary brain tumours in the United States. 2010. <http://www.cbtrus.org>
- 4.-Ohgaki H, Kleihues P. Population-based studies on incidence, survival rates and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2005; 64 (6): 479-89.
- 5.- Lafitte F, Morel-Precetti S, Martin-Duverneuil N et al. Multiple glioblastomas: CT and MR features. *Eur Radiol.* 2001;11(1):131-6.
- 6.- Ohgaki H, Dessen P, Jourde B et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res.* 2004; 64(19):6892-9.
- 7.- Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol.* 2007 May;170(5):1445-53.
- 8.- Watanabe K, Sato K, Biernat W et al. Incidence and timing of p53 mutations during astrocytoma progression in patients with multiple biopsies. *Clin Cancer Res.* 1997; 3 (4): 523-30.
- 9.- Okamoto Y, Di Patre PL, Burkhard C et al. Population-based study on incidence, survival rates, and genetic alterations of low-grade diffuse astrocytomas and oligodendrogliomas. *Acta Neuropathol.* 2004;108(1):49-56.
- 10.- Shafqat S, Hedley-Whyte ET, Henson JW. Age-dependent rate of anaplastic transformation in low-grade astrocytoma. *Neurology.* 1999 Mar 10;52(4):867-9.
- 11.- Peraud A, Ansari H, Bise K, Reulen HJ. Clinical outcome of supratentorial astrocytoma WHO grade II. *Acta Neurochir (Wien).* 1998; 140(12): 1213-22.
- 12.- van Veelen ML, Avezaat CJ, Kros JM, van Putten W, Vecht C. Supratentorial low grade astrocytoma: prognostic factors, dedifferentiation, and the issue of early versus late surgery. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1998; 64(5): 581-7.
- 13.- Karim AB, Maat B, Hatlevoll R et al. A randomized trial on dose-response in radiation therapy of low-grade cerebral glioma: European Organization for Research

and Treatment of Cancer (EORTC) Study 22844. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1996; 36(3): 549-56.

14.- Jaros E, Perry RH, Adam L, Kelly PJ et al. Prognostic implications of p53 protein, epidermal growth factor receptor and Ki-67 labelling in brain tumours. *Br J Cancer.* 1992; 66(2): 373-85.

15.- Ständer M, Peraud A, Leroch B, Kreth FW. Prognostic impact of TP53 mutation status for adult patients with supratentorial World Health Organization Grade II astrocytoma or oligoastrocytoma: a long-term analysis. *Cancer.* 2004; 101(5): 1028-35.

16.- Järvelä S, Helin H, Haapasalo J et al. Amplification of the epidermal growth factor receptor in astrocytic tumours by chromogenic in situ hybridization: association with clinicopathological features and patient survival. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2006; 32(4): 441-50.

17.- Curran WJ Jr, Scott CB, Horton J 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.

18.- Pierallini A, Bonamini M, Pantano P et al. Radiological assessment of necrosis in glioblastoma: variability and prognostic value. *Neuroradiology.* 1998; 40(3): 150-3.

19.- 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.

20.- Tso CL, Freije WA, Day A et al. Distinct transcription profiles of primary and secondary glioblastoma subgroups. *Cancer Res.* 2006; 66(1): 159-67.

21.- Pelloski CE, Mahajan A, Maor M et al. YKL-40 expression is associated with poorer response to radiation and shorter overall survival in glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 2005; 11(9): 3326-34.

22.- Pignatti F, van den Bent M, Curran D et al. Prognostic factors for survival in adult patients with cerebral low-grade glioma. *J Clin Oncol.* 2002; 20(8): 2076-84.

23.- Kidd EA, Mansur DB, Leonard JR, Michalski JM, Simpson JR, Perry A. The efficacy of radiation therapy in the management of grade I astrocytomas. *J Neurooncol.* 2006; 76(1): 55-8.

- 24.- van den Bent MJ, Afra D, de Witte O et al. Long-term efficacy of early versus delayed radiotherapy for low-grade astrocytoma and oligodendroglioma in adults: the EORTC 22845 randomised trial. *Lancet*. 2005; 366(9490): 985-90.
- 25.- Prados MD, Scott C, Curran WJ Jr, Nelson DF, Leibel S, Kramer S. Procarbazine, lomustine, and vincristine (PCV) chemotherapy for anaplastic astrocytoma: A retrospective review of radiation therapy oncology group protocols comparing survival with carmustine or PCV adjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol*. 1999; 17(11): 3389-95.
- 26.- Stewart LA. Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. *Lancet*. 2002;359(9311):1011-8.
- 27.- Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen HJ; ALA-Glioma Study Group. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol*. 2006; 7(5): 392-401.
- 28.-Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352:987-96.
- 29.- Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005; 352(10): 997-1003.
- 30.-Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*. 2008; 455(7216): 1061-8.
- 31.- Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. 2010; 17(1): 98-110.
- 32.-Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2009; 8(8): 627-44.
- 33.-Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*. 2007; 129(7): 1261-74.
- 34.- Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*. 1998; 4(7): 844-7.

- 35.- Medema R.H., Kops G.J.P.L., Bos J.L., Burgering B.M.T. AFX-like forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature*. 2000;404(6779):782-7.
- 36.- Kops GJ, de Ruiter ND, De Vries-Smits AM, Powell DR, Bos JL, Burgering BM. Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature*. 1999 Apr 15;398(6728):630-4.
- 37.- Zhang X, Gan L, Pan H, Guo S, He X, Olson ST et al. Phosphorylation of serine 256 suppresses transactivation by FKHR (FOXO1) by multiple mechanisms. Direct and indirect effects on nuclear/cytoplasmic shuttling and DNA binding. *J Biol Chem*. 2002; 277(47): 45276-84.
- 38.- Seoane J, Le HV, Shen L, Anderson SA, Massagué J. Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell*. 2004; 117(2): 211-23.
- 39.- Accili D, Arden KC. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell*. 2004; 117(4): 421-6.
- 40.- Shin I, Yakes FM, Rojo F et al. PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat Med*. 2002; 8(10): 1145-52
- 41.- Grimmler M, Wang Y, Mund T et al. Cdk-inhibitory activity and stability of p27Kip1 are directly regulated by oncogenic tyrosine kinases. *Cell*. 2007 Jan 26; 128(2): 269-80.
- 42.- Ishida N, Kitagawa M, Hatakeyama S, Nakayama K. Phosphorylation at serine 10, a major phosphorylation site of p27(Kip1), increases its protein stability. *J Biol Chem*. 2000; 275(33): 25146-54.
- 43.- Malumbres M, Barbacid M. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci*. 2005; 30(11): 630-41.
- 44.- Grimmler M, Wang Y, Mund T et al. Cdk-inhibitory activity and stability of p27Kip1 are directly regulated by oncogenic tyrosine kinases. *Cell*. 2007; 128(2): 269-80.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Anexo 1. Clasificación de Tumores de Sistema Nervioso Central de la Organización Mundial de la Salud. Cuarta edición

TUMOURS OF NEUROEPITHELIAL TISSUE

Astrocytic tumours

Pilocytic astrocytoma	9421/1 ¹
Pilomyxoid astrocytoma	9425/3*
Subependymal giant cell astrocytoma	9384/1
Pleomorphic xanthoastrocytoma	9424/3
Diffuse astrocytoma	9400/3
Fibrillary astrocytoma	9420/3
Gemistocytic astrocytoma	9411/3
Protoplasmic astrocytoma	9410/3
Anaplastic astrocytoma	9401/3
Glioblastoma	9440/3
Giant cell glioblastoma	9441/3
Gliosarcoma	9442/3
Gliomatosis cerebri	9381/3

Oligodendroglial tumours

Oligodendroglioma	9450/3
Anaplastic oligodendroglioma	9451/3

Oligoastrocytic tumours

Oligoastrocytoma	9382/3
Anaplastic oligoastrocytoma	9382/3

Ependymal tumours

Subependymoma	9383/1
Myxopapillary ependymoma	9394/1
Ependymoma	9391/3
Cellular	9391/3
Papillary	9393/3
Clear cell	9391/3
Tanycytic	9391/3
Anaplastic ependymoma	9392/3

Choroid plexus tumours

Choroid plexus papilloma	9390/0
Atypical choroid plexus papilloma	9390/1*
Choroid plexus carcinoma	9390/3

Other neuroepithelial tumours

Astroblastoma	9430/3
Chordoid glioma of the third ventricle	9444/1
Angiocentric glioma	9431/1*

¹ Morphology code of the International Classification of Diseases for Oncology (ICD-O) (814A) and the Systematized Nomenclature of Medicine (<http://snomed.org>). Behaviour is coded /0 for benign tumours, /3 for malignant tumours and /1 for borderline or uncertain behaviour.

* The italicised numbers are provisional codes proposed for the 4th edition of ICD-O. While they are expected to be incorporated into the next ICD-O edition, they currently remain subject to change.

Neuronal and mixed neuronal-glial tumours

Dysplastic gangliocytoma of cerebellum (Lhermitte-Duclos)	9493/0
Desmoplastic infantile astrocytoma/ganglioglioma	9412/1
Dysembryoplastic neuroepithelial tumour	9413/0
Gangliocytoma	9492/0
Ganglioglioma	9505/1
Anaplastic ganglioglioma	9505/3
Central neurocytoma	9506/1
Extraventricular neurocytoma	9506/1*
Cerebellar liponeurocytoma	9506/1*
Papillary glioneuronal tumour	9509/1*
Rosette-forming glioneuronal tumour of the fourth ventricle	9509/1*
Paraganglioma	8680/1

Tumours of the pineal region

Pineocytoma	9361/1
Pineal parenchymal tumour of intermediate differentiation	9362/3
Pineoblastoma	9362/3
Papillary tumour of the pineal region	9395/3*

Embryonal tumours

Medulloblastoma	9470/3
Desmoplastic/nodular medulloblastoma	9471/3
Medulloblastoma with extensive nodularity	9471/3*
Anaplastic medulloblastoma	9474/3*
Large cell medulloblastoma	9474/3
CNS primitive neuroectodermal tumour	9473/3
CNS Neuroblastoma	9500/3
CNS Ganglioneuroblastoma	9490/3
Medulloepithelioma	9501/3
Ependymblastoma	9392/3
Atypical teratoid / rhabdoid tumour	9508/3

TUMOURS OF CRANIAL AND PARASPINAL NERVES

Schwannoma (neurilemoma, neurinoma)	9560/0
Cellular	9560/0
Plexiform	9560/0
Melanotic	9560/0

Neurofibroma	9540/0
Plexiform	9550/0

Perineurioma		Haemangiopericytoma	9150/1
Perineurioma, NOS	9571/0	Anaplastic haemangiopericytoma	9150/3
Malignant perineurioma	9571/3	Angiosarcoma	9120/3
		Kaposi sarcoma	9140/3
Malignant peripheral		Ewing sarcoma - PNET	9364/3
nerve sheath tumour (MPNST)			
Epithelioid MPNST	9540/3	Primary melanocytic lesions	
MPNST with mesenchymal differentiation	9540/3	Diffuse melanocytosis	8728/0
Melanotic MPNST	9540/3	Melanocytoma	8728/1
MPNST with glandular differentiation	9540/3	Malignant melanoma	8720/3
		Meningeal melanomatosis	8728/3
TUMOURS OF THE MENINGES		Other neoplasms related to the meninges	
		Haemangioblastoma	9161/1
Tumours of meningotheial cells			
Meningioma	9530/0	LYMPHOMAS AND HAEMATOPOIETIC	
Meningothelial	9531/0	NEOPLASMS	
Fibrous (fibroblastic)	9532/0	Malignant lymphomas	9590/3
Transitional (mixed)	9537/0	Plasmacytoma	9731/3
Psammomatous	9533/0	Granulocytic sarcoma	9930/3
Angiomatous	9534/0		
Microcystic	9530/0		
Secretory	9530/0	GERM CELL TUMOURS	
Lymphoplasmacyte-rich	9530/0	Germinoma	9064/3
Metaplastic	9530/0	Embryonal carcinoma	9070/3
Chordoid	9538/1	Yolk sac tumour	9071/3
Clear cell	9538/1	Choriocarcinoma	9100/3
Atypical	9539/1	Teratoma	9080/1
Papillary	9538/3	Mature	9080/0
Rhabdoid	9538/3	Immature	9080/3
Anaplastic (malignant)	9530/3	Teratoma with malignant transformation	9084/3
		Mixed germ cell tumour	9085/3
Mesenchymal tumours			
Lipoma	8850/0	TUMOURS OF THE SELLAR REGION	
Angiolipoma	8861/0	Craniopharyngioma	9350/1
Hibernoma	8880/0	Adamantinomatous	9351/1
Liposarcoma	8850/3	Papillary	9352/1
Solitary fibrous tumour	8815/0	Granular cell tumour	9582/0
Fibrosarcoma	8810/3	Pituicytoma	9432/1*
Malignant fibrous histiocytoma	8830/3	Spindle cell oncocytoma	
Leiomyoma	8890/0	of the adenohypophysis	8291/0*
Leiomyosarcoma	8890/3		
Rhabdomyoma	8900/0	METASTATIC TUMOURS	
Rhabdomyosarcoma	8900/3		
Chondroma	9220/0		
Chondrosarcoma	9220/3		
Osteoma	9180/0		
Osteosarcoma	9180/3		
Osteochondroma	9210/0		
Haemangioma	9120/0		
Epithelioid haemangioendothelioma	9133/1		

Anexo 2. Grado tumoral Clasificación de Tumores del Sistema Nervioso Central de la Organización Mundial de la Salud.

- Grado I: tumores con bajo potencial proliferativo y con posibilidad de curación tras tratamiento exclusivamente quirúrgico.
- Grado II: tumores generalmente infiltrativas en esencia, por lo que a pesar de su baja tasa de proliferación, recurren. Estos tumores presentan como hallazgo anatomopatológico exclusivamente atipia.
- Grado III: lesiones con mayor malignidad histológica, además de atipia presentan anaplasia y actividad mitótica.
- Grado IV: tumores citológicamente malignos, mitóticamente activos que presenta necrosis.

Anexo 3. Índice de Karnofsky

- 100: Normal, sin quejas, sin indicios de enfermedad.
- 90: Actividad normales, pero con signos y síntomas leves de enfermedad.
- 80: Actividad normal con esfuerzo, con algunos signos y síntomas de enfermedad.
- 70: Capaz de cuidarse, pero incapaz de llevar a término actividades normales o trabajo activo.
- 60: Requiere atención ocasional, pero puede cuidarse a sí mismo.
- 50: Requiere gran atención, incluso de tipo médico. Encamado menos del 50% del día.
- 40: Inválido, incapacitado, necesita cuidados y atenciones especiales. Encamado más del 50% del día.
- 30: Inválido grave, severamente incapacitado, tratamiento de soporte activo.
- 20: Encamado por completo, paciente muy grave, necesita hospitalización y tratamiento activo.
- 10: Moribundo.
- 0: Fallecido.

Anexo 4. Criterios de McDonald

- Repuesta completa: desaparición de todas las lesiones tumorales hipercaptantes en TC y RM, durante al menos un mes, sin corticoides y neurológicamente estable o con mejoría de la clínica.
- Respuesta parcial: disminución mayor o igual del 50% de la captación tumoral en TC o RM consecutivos, con dosis de corticoide estables o menores, con clínica neurológica estable o mejorada.
- Progresión de la enfermedad: aumento en un 25% o más de la captación tumoral mediante TC o RM, empeoramiento neurológico y dosis de corticoide estables o en aumento
- Enfermedad estable: todas las otras situaciones.

Tabla 1. Características de los pacientes

Glioblastoma (n)	55
Edad (años)	
media (rango)	58,4 (23-78)
Razon varon:mujer	2:01
Sintoma al diagnostico	
Cefalea	32,70%
Afasia	18,20%
Trastorno motor	18,20%
Inestabilidad cefálica	16,40%
Disminución nivel de consciencia	12,70%
Crisis comicial	9,10%
Alteración visual	5,50%
Otros síntomas	36,40%
Localización	
Frontal	37,30%
Temporal	37,30%
Parietal	17,60%
Estructuras centrales (no gánglios de la base)	15,70%
Occipital	11,80%
Gánglios de la base	11,80%
Cerebelo	2,00%
Insula	2,00%
Multicentricidad	14,50%
Tipo de cirugía	
Resección completa	33,30%
Resección parcial	48,10%
Biopsia	18,50%
Tratamiento radioterápico (n)	42
Radioterapia 46 Gy + boost hasta 60 Gy	83,30%
Radioterapia paliativa	16,70%
Quimioterapia concomitante y adyuvante	64,50%
Numero de ciclos media (rango)	4 (0-14)
Progresión (n)	44
Cirugía rescate (n)	6
Astrocitoma anaplásico	13
Edad (años)	
media (rango)	45,92 (28-72)
Sintoma al diagnostico	
Crisis comicial	53,80%
Trastorno motor	23,10%
Cefalea	7,70%
Inestabilidad cefálica	7,70%
Otros síntomas	23,10%
Localización	
Frontal	66,70%
Temporal	16,70%
Gánglios de la base	16,70%
Otras estructuras centrales	16,70%
Insula	8,30%

Occipital	8,30%
Parietal	8,30%
Tipo de cirugía	
Resección completa	38,5%
Resección parcial	38,50%
Biopsia	23,10%
Tratamiento radioterápico (n)	12
Inmediata	83,3%
A la progresión	16,3%
Quimioterapia concomitante y adyuvante (n)	11
Progresión (n)	9
Astrocitoma difuso	13
Edad (años)	
media (rango)	42 (6-68)
Sintoma al diagnóstico	
Crisis comicial	53,80%
Cefalea	30,80%
Afasia	15,40%
Inestabilidad cefálica	7,70%
Disminución nivel de consciencia	7,70%
Otros síntomas	23,10%
Localización	
Frontal	60%
Temporal	50%
Gánglios de la base	20%
Insula	10%
Parietal	10%
Tipo de cirugía	
Resección completa	46,20%
Resección parcial	38,50%
Biopsia	15,40%
Tratamiento radioterápico (n)	11
Inmediata	8
Diferida	3
Progresión	5

Tabla 2. Análisis supervivencia libre de progresión

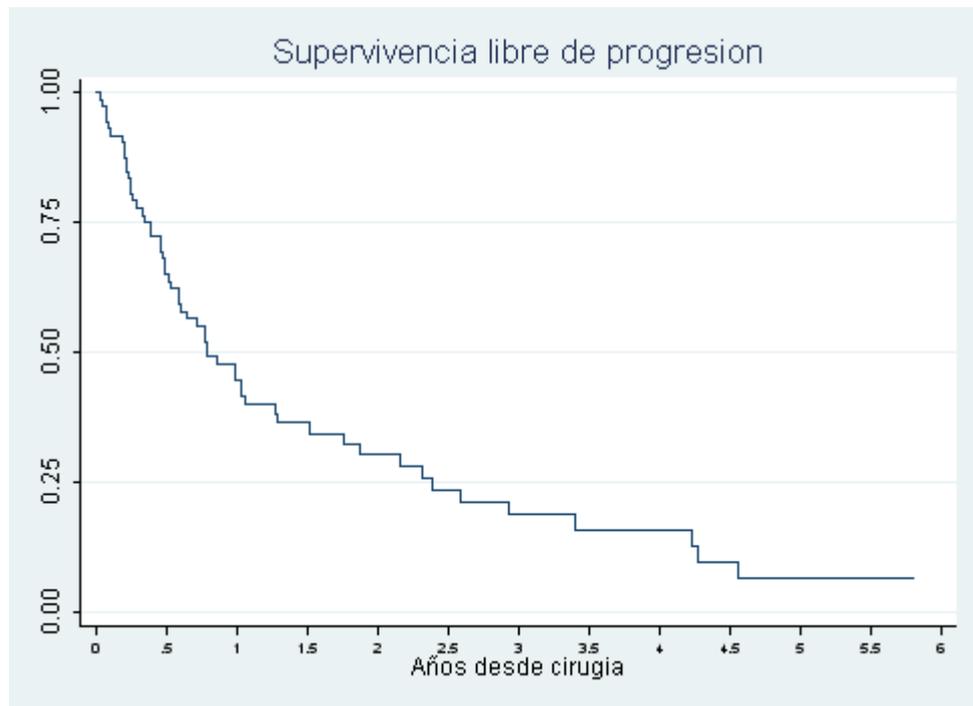
Análisis univariante

Variable	Haz. Ratio	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf	. Interval]
Resección parcial	.6299202	.2196036	-1.33	0.185	0,3180816	-1,2474770
Resección completa	.3164192	.1208915	-3.01	0.003	0,1496414	-0,6690736
Grado 3	1.444.403	.766105	0.69	0.488	0,5107577	-0,4084716
Grado 4	4.045.388	.1825273	3.10	0.002	1,6707040	-0,9795375
Edad	1.044.615	.0098662	4.62	0.000	1,0254550	-1,0641320
p27	.9951595	.0018041	-2.68	0.007	0,9916297	-0,9987018
pFOXO	100.801	.0025573	3.14	0.002	1,0030110	-1,0130350
pAKT	1.008.102	.0021949	3.71	0.000	1,0038090	-1,0124130

Análisis multivariante

Variable	Haz. Ratio	Std. Err.	z	P> z	Intervalo confianza 95%
Edad	1,0331740	0,0110671	3,05	0,002	1,0117090 -1,0550950
Resección completa	0,2934622	0,1483698	-2,42	0,015	0,1089427 -0,7905075
pFOXO	1,0097200	0,0032906	2,97	0,003	1,0032910 -1,0161900
p27	0,9918619	0,002287	-3,54	0.000	0,9873897 -0,9963544

Figura 1. Supervivencia libre de progresión



ÍNDICE DE ABREVIATURAS

4EBP1: initiation factor 4E-binding protein

AKT: serin/treonin kinasa Akt

ASCL1: Achaete-scute homolog 1

BAD: Bcl2 antagonist of cell death

CDKN2A: Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A

CHI3L1: Chitinase-3-like protein 1

DCX: Neuronal migration protein doublecortin

DLL3: Delta-like protein 3

ERBB2: avian erythroblastosis oncogene B 2, gen del receptor Erb-2

EGFR (Epidermal Growth Factor): Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico

FGAP: proteína fibrilar glial acídica

FOXO: Forkhead box protein O1

GPCRs: receptores acoplados a proteínas G

GSK3: Glycogen synthase kinase-3

HIF: factor inducible por hipoxia

IDH1: isocitrato deshidrogenasa

LOH (Loss of heterozygosity) Pérdida de heterocigosidad

MDM2: murine doble minute 2

MET: Hepatocyte growth factor receptor

MGMT: Methylated-DNA--protein-cysteine methyltransferase

mTOR: mammalian target of rapamycin

NF1: neurofibromina

OLIG2: Oligodendrocyte transcription factor 2

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PTEN Phosphatase and tensin homolog

PDGFRA: gen del receptor del factor de crecimiento plaquetario

PI3K: (phosphoinositol 3 phosphate kinase) kinasa de fosfoinositos 3 fostfato

PIK3CA: gen codificante de subunidad catalítica PI3K

PIK3R1, PIK3R2, PIK3R3: genes codificante subunidad reguladora PI3K

PRAS40: proline-rich AKT substrate 40 kDa

RAS: gen "Rat Sarcoma"

RTK: receptor tirosin kinasa

RTOG: Radiation Therapy Oncology Group

SNC: Sistema Nervioso Central

TCF3: Transcription factor 3

TCF4: Transcription factor 4

TCGA: "The Cancer Genome Atlas"

TNF: factor de necrosis tumoral

TP53 gen que codifica p53 (proteína 53)

TSC2: tuberous sclerosis 2 protein

S6K1: ribosomal protein S6 kinase 1

SOX: Sry-related HMG box

YKL-40: chitinase-3-like-1

AGRADECIMIENTOS

Grupo de Investigación de Expresión Génica y Cáncer. Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebron

Gerard Folch Codera

Servicio de Oncología Médica. Hospital Vall d'Hebron

Jordi Rodon Ahnert

César Serrano García

Eva Muñoz Couelo

Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Vall d'Hebron

Ludmila Prudkin Vidal

Arantxa Ortega Aznar

Santiago Ramón y Cajal Agüeras

Servicio de Oncología Radioterápica. Hospital Vall d'Hebron

Xavier Maldonado Pijoan

Servicio de Medicina Preventiva y Epidemiología. Hospital Vall d'Hebron. Unidad de Soporte en Metodología para la Investigación Biomédica (USMIB)

Santiago Perez Hoyos