

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Estudio de alteraciones moleculares de Glioblastomas con
larga supervivencia mediante secuenciación masiva (NGS)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Diana Cantero Montenegro

Directores

Aurelio Hernández Laín
Bárbara Beatriz Meléndez Asensio

Madrid

© Diana Cantero Montenegro, 2024

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Estudio de alteraciones moleculares de Glioblastomas
con larga supervivencia mediante secuenciación
masiva (NGS)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Diana Cantero Montenegro

DIRECTORES

Aurelio Hernández Laín
Bárbara Beatriz Meléndez Asensio

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Doctorado en Investigación en Ciencias Médico-Quirúrgicas



TESIS DOCTORAL

**Estudio de alteraciones moleculares de Glioblastomas
con larga supervivencia mediante secuenciación
masiva (NGS)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Diana Cantero Montenegro

DIRECTORES

Aurelio Hernández Laín

Bárbara Beatriz Meléndez Asensio

Madrid, 2023

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de todo el proceso de realización de esta tesis doctoral, he recibido el apoyo, ánimo y colaboración de numerosas personal a las que debo mi gratitud.

En primer lugar, a mis directores de Tesis; A la Dra. Bárbara Meléndez Asensio, por tu apoyo, paciencia y ánimo para continuar y finalizar este trabajo. Sin tu persistencia no habría sido capaz de llegar hasta aquí. Al Dr. Aurelio Hernandez Laín, por tu apoyo, confianza, y la oportunidad de trabajar a tu lado. Gracias a ambos por todos los conocimientos que me habéis transmitido a lo largo de estos años.

Me gustaría agradecer también a mi tutor de tesis, el Dr. José Luis Rodríguez Peralto, por tu apoyo y tu confianza a lo largo de todos los años que me has permitido trabajar, aprender y crecer personal y profesionalmente en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital 12 de Octubre (Madrid). Gracias.

No me gustaría dejar de agradecer a la Dra. Yolanda Ruano Dominguez, Yoli, por tu apoyo y enseñanzas dentro del laboratorio de biología molecular. Tú me has enseñado todo lo que sé dentro de un laboratorio.

Agradecer también a todas las personas con las que he compartido experiencias y aprendido todos estos años dentro del servicio de Anatomía Patológica del Hospital 12 de Octubre. Desde secretaria, celadores, técnicos de laboratorio (Rocío, Lidia, Susana, Samuel, Pilar, Vicente, Nuria, Borja, Álvaro, Vera...), patólogos (Oscar, Yolanda, Ana Belén...), biólogos (Leyla, Rosa) sois muchos los que formáis parte de ese gran equipo, gracias por haberme hecho sentir parte de esta gran familia. También agradecer al Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre, por facilitar los medios y recursos para la realización de este trabajo, gracias a Juan Carlos, Inma, Aitor por compartir conmigo vuestros conocimientos.

Por último, quisiera agradecer a todas las personas que con su apoyo personal y emocional me han permitido superar estos últimos meses para acabar este trabajo

A mi familia, agradecerles su cariño y apoyo incondicional. A mis padres, por su esfuerzo y sacrificio a lo largo de esta vida para hacer de mí quien soy. A Ana, mi hermana, por su energía para ayudarme a afrontar este reto.

A Rubén, por tu ayuda, respaldo y cariño fundamental para permitirme realizar este proyecto.

En general quisiera agradecer a todas y cada una de las personas que han vivido conmigo la realización de esta tesis doctoral, con sus altibajos y que no necesito nombrar porque tanto ellas como yo sabemos que de corazón les agradezco todo el apoyo, colaboración, ánimo, cariño y amistad.

A Enzo

*“La satisfacción radica en el
esfuerzo, no en el logro. El esfuerzo total
es la victoria total”. (Gandhi)*

Este trabajo ha contado con el apoyo de las becas P113/00800 y P113/01258 del Fondo de Investigaciones Sanitarias del Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación, cofinanciadas por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER 2007-2013) "Unión Europea" "Una manera de hacer Europa". También ha contado con el apoyo de las becas del Grupo Español de Investigación Neuro-Oncológica (GEINO) del año 2012, "Análisis histológico, radiológico y molecular de la respuesta a bevacizumab en pacientes con recidiva de glioblastoma. Búsqueda de marcadores predictivos" y año 2013 "Generación de una plataforma diagnóstica específica para la determinación de mutaciones en gliomas mediante análisis de secuenciación a gran escala. Correlación con datos clínicos".

ÍNDICE

ÍNDICE	13
ÍNDICE DE FIGURAS	17
ÍNDICE DE TABLAS	19
ABREVIATURAS	21
RESUMEN	23
ABSTRACT	27
LIMITACIONES	31
INTRODUCCIÓN	35
1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LOS TUMORES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	35
1.1. Epidemiología	35
1.2. Características histopatológicas y clínicas del glioblastoma	37
1.3. Pronóstico, tratamiento y supervivencia del GB	39
2. ALTERACIONES MOLECULARES EN GLIOMAS DIFUSOS	41
2.1. Mutación de los genes <i>IDH1/IDH2</i> (IDH)	41
2.2. Alteraciones en genes implicados en el mantenimiento de los telómeros	43
2.3. Principales alteraciones de las vías de señalización en el GB	46
2.4. Metilación del promotor del gen <i>MGMT</i> en el glioblastoma	47
3. DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO Y MOLECULAR DE LOS TUMORES GLIALES: CLASIFICACIÓN DE LA ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD	48
3.1. Generalidades	48
3.2. El GB en la nueva clasificación de la OMS	51
3.3. Subtipos de GB	52
3.3.1. GB de células gigantes	52
3.2.2. Gliosarcoma	53
3.2.3. GB epiteloide	53
HIPÓTESIS y OBJETIVOS	57
MATERIAL Y MÉTODOS	61
4. MATERIAL	61
4.1. Pacientes seleccionados	61
4.2. Muestras tisulares	63
4.3. Recogida de datos clínicos, anatomopatológicos y moleculares	63
5. METODOLOGÍA	64
5.1. Extracción de ácidos nucleicos y cuantificación	64

5.2. Análisis de secuenciación masiva (Next Generation Sequencing)	65
5.2.1 Diseño de un panel de NGS para el análisis de genes implicados en gliomas	65
5.2.2 Preparación de librerías	66
5.2.3 Amplificación y secuenciación de librerías	68
5.2.4 Análisis bioinformático.....	70
5.2.5 Validación de resultados obtenidos por NGS mediante base de datos públicos .	71
5.2.6 Análisis de carga mutacional tumoral mediante NGS.....	72
5.3. Piro-secuenciación	72
5.3.1 Diseño de primers para la piro-secuenciación.....	73
5.3.2 Amplificación mediante PCR y piro-secuenciación	74
5.4. Secuenciación Sanger.....	74
5.5. Análisis de metilación promotor del gen MGMT	75
5.5.1 Tratamiento con bisulfito.....	75
5.5.2 PCR específica metilación (MS-PCR)	76
5.6. Estudio de Hibridación In Situ Fluorescente (FISH).....	77
5.6.1 FISH de <i>EGFR</i> y <i>CDKN2A</i>	77
5.7. Estudio Inmunohistoquímico	78
5.8. Análisis estadístico	79
RESULTADOS	83
6. RESULTADOS	83
6.1. DISEÑO Y VALIDACIÓN DE UN PANEL DIRIGIDO DE GENES PARA EL ESTUDIO MOLECULAR DE LOS GLIOMAS MEDIANTE NGS	83
6.1.1 Diseño del panel dirigido de genes GLIO-NGS-30.....	83
6.1.2 Validación del panel GLIO-NGS-30.....	84
6.1.3 Desarrollo de un método basado en el z-score para la detección de CNVs	87
6.2. DETECCIÓN DE ALTERACIONES GENÉTICAS MEDIANTE EL PANEL DIRIGIDO DE GENES GLIO-NGS-30	89
6.2.1 Detección de mutaciones.....	89
6.2.2 Detección de CNVs.....	91
6.2.3 Análisis de CNVs con el software Ion Reporter (IR)	91
6.2.4 Análisis de CNVs mediante el método de z-score.....	92
6.2.5 Comparativa de los métodos utilizados para el análisis de CNVs.....	95
6.2.6 Validaciones de CNVs realizadas con métodos ortogonales.....	96
6.3. ANÁLISIS DE LOS MARCADORES MOLECULARES TERT Y MGMT.....	99
6.4. RESUMEN DE LAS ALTERACIONES MOLECULARES IDENTIFICADAS MEDIANTE NGS EN LA SERIE DE GLIOMAS ANALIZADA Y COMPARACIÓN CON BASES DE DATOS EXTERNAS.....	99

6.5. ANÁLISIS DE LOS FACTORES ASOCIADOS A LA SUPERVIVENCIA DE LOS PACIENTES	
101	
6.5.1 Características clínicas de los pacientes y su asociación con la supervivencia global.....	101
6.5.2 Características moleculares de los tumores y su asociación con la supervivencia de los pacientes.....	106
6.5.3 Análisis LTS vs Non-LTS en la serie de GB TCGA PanCancer-Atlas.	113
6.6. ANÁLISIS DE GBs CON CÉLULAS GIGANTES	116
6.6.1 Características clínicas	116
6.6.2 Características histológicas e inmunohistoquímicas.....	116
6.6.3 Características moleculares	118
6.6.4 Análisis de la carga mutacional o Tumor Mutation Load (TML)	119
6.6.5 Correlación clínica, histológica y molecular	121
6.6.6 Estudio TCGA casos con GB-CG.....	122
6.6.7 Análisis de supervivencia	125
DISCUSIÓN	129
7. DISCUSIÓN.....	129
7.1. DISEÑO Y VALIDACIÓN DE UN PANEL DE NGS PARA EL ESTUDIO Y DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LOS GLIOMAS	129
7.2. BIOMARCADORES PRONÓSTICOS	133
7.3. ANALISIS DE GB CON CÉLULAS GIGANTES.....	140
CONCLUSIONES.....	147
BIBLIOGRAFÍA	151
ANEXOS.....	169

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Datos de nuevos casos de cáncer al año..... 35

Figura 2. Tipos de cáncer responsables de la mayor mortalidad en España. 36

Figura 3. Distribución de tumores del SNC por subtipo histológico. 37

Figura 4. Microfotografías de cortes de tejido tumoral de GB teñidos con Hematoxilina-Eosina..... 38

Figura 5. Mecanismo de acción del fármaco Temozolomida..... 40

Figura 6. Esquema de la alteración del metabolismo en células con mutaciones en IDH..... 42

Figura 7. Mutaciones detectadas en IDH1 e IDH2 y la frecuencia observada de estas mutaciones en tumores del SNC..... 42

Figura 8. Factores que afectan al acortamiento de telómeros..... 43

Figura 9. Mecanismo de acción de TERT..... 44

Figura 10. Mecanismo de acción del complejo ATRX/DAXX..... 45

Figura 11. Frecuencia y tipos de alteraciones detectadas en los diferentes genes de las principales vías de señalización alteradas en GB..... 46

Figura 12. Criterios histológicos y moleculares en el diagnóstico y clasificación de los tumores gliales según la clasificación de la OMS de 2021..... 50

Figura 13. Imagen histológica de un GB de células gigantes. T 52

Figura 14. Flujo de trabajo para la preparación de librerías..... 66

Figura 15. Purificación magnética de ADN..... 67

Figura 16. PCR de emulsión tecnología Ion Torrent..... 69

Figura 17. Sistema de secuenciación por semiconductores con la tecnología Ion Torrent de detección de H+. 69

Figura 18. Flujo de trabajo para el análisis de resultados secuenciación masiva. 70

Figura 19. Esquema que muestra la cascada de pirosecuenciación..... 73

Figura 20. Diseño de la sonda para estudio de (A) amplificaciones del gen EGFR y (B) deleciones de CDKN2A..... 78

Figura 21. Estudio de CNVs mediante z-score., 88

Figura 22. Frecuencia de las variantes detectadas clasificadas según el tipo de variante y efecto. 89

Figura 23. Frecuencia de mutaciones detectadas de cada gen del panel GLIO-NGS-30 (mutaciones puntuales e INDELS). 90

Figura 24. Tipo de mutación detectada dentro de los genes alterados con mayor frecuencia con el panel GLIO-NGS-30..... 91

Figura 25. Frecuencia de CNVs obtenidos mediante el software IR (A) y método z-score (B). 92

Figura 26. Análisis de CNVs. 93

Figura 27. Representación gráfica en escala logarítmica de la cobertura relativa (Cob relativa). 94

Figura 28. Comparativa de los resultados obtenidos en el estudio de CNVs con el software IR (azul) y mediante el análisis del z-score (naranja). 95

Figura 29. Resultados globales (mutaciones y CNVs) detectados mediante secuenciación masiva con panel GLIO-NGS-30 en 183 glioblastomas. 99

Figura 30. Comparación de la frecuencia de alteraciones detectadas en la serie estudiada con el panel GLIO-NGS-30 frente a los resultados publicados en la base de datos TCGA de la serie de GB PanCancerAtlas. 100

Figura 31. Curva de supervivencia global (Kaplan-Meier) de los pacientes incluidos en el estudio en función de las características clínicas. 104

Figura 32. Resumen de las alteraciones moleculares detectadas mediante secuenciación del panel GLIO-NGS-30 e inmunohistoquímica (IHQ) en la serie estudiada (157 casos). 107

Figura 33. Frecuencia genes alterados en los grupos LTS y Non-LTS. 108

Figura 34. Resumen de las características clínicas y moleculares de los pacientes con alteraciones en los genes IDH1 e IDH2 dentro de la serie estudiada. 109

Figura 35. Curvas supervivencia global Kaplan-Meier en función del gen alterado. 110

Figura 36. Comparación de la frecuencia alteraciones génicas entre LTS y Non-LTS excluyendo aquellos casos sin mutaciones en IDH, H3F3A y BRAF. 112

Figura 37. Imágenes de tejido tumoral de GBs con presencia de células gigantes. 117

Figura 38. Características histopatológicas de 36 glioblastomas con células gigantes. 118

Figura 39. Alteraciones genéticas e histopatológicas de los glioblastomas con células gigantes. 118

Figura 40. Perfil de mutaciones somáticas obtenido en los tres tumores con mayor carga mutacional. 121

Figura 41. Gráfica comparativa de la frecuencia de alteraciones en los genes analizados en la serie estudiada frente a los casos del TCGA. 123

Figura 42. Resumen de alteraciones genéticas más relevantes de los 76 tumores del TCGA evaluados morfológicamente (TP53 mutado e IDH no mutado). 123

Figura 43. Comparativa de la frecuencia de alteraciones genéticas entre aquellos casos con TP53 mutado sin células gigantes y aquellos con células gigantes dentro de la serie del TCGA frente a la serie estudiada. 124

Figura 44. Análisis de supervivencia global (SG) (Kaplan-Meier) en tumores con células gigantes. 126

Figura 45. Resumen de las reacciones bioquímicas para la producción de energía y lípidos en la célula en las que interviene IDH. 135

Figura 46. Mutaciones y frecuencia de las mutaciones en el gen PIK3CA. 138

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales características del GB IDHwt y GB IDH mutado. Datos obtenidos de la actualización de 2016 de la clasificación de tumores del SNC [5]	51
Tabla 2. Genes seleccionados para el diseño de panel GLIO-NGS-30.....	65
Tabla 3. Genes y/o regiones génicas diseñadas para estudio de CNVs dentro del panel GLIO-NGS-30	66
Tabla 4. Secuencia de los primers utilizados para la amplificación y secuenciación mediante pirosecuenciación	73
Tabla 5. Condiciones amplificación productos pirosecuenciación	74
Tabla 6. Secuencia de los primers utilizados para detectar la secuencia metilada y no metilada del promotor del gen MGMT	76
Tabla 7. Condiciones de amplificación mediante PCR para la detección de secuencia metilada y no metilada del promotor gen MGMT	76
Tabla 8. Anticuerpos empleados, diluciones y condiciones de tinción.....	79
Tabla 9. Resumen del diseño del panel de genes GLIO-NGS-30	83
Tabla 10. Variantes identificadas en muestras de tejido no tumoral	84
Tabla 11. Variantes identificadas en muestras tumorales.....	85
Tabla 12. Variantes detectadas con el panel GLIO-NGS-30 y validación con el panel FOCDx.	86
Tabla 13. Resumen mutaciones en regiones no hotspot detectadas en los genes IDH1 e IDH2.....	90
Tabla 14. Comparativa de los resultados obtenidos en el estudio de CNVs con el software IR y mediante el análisis del z-score.....	95
Tabla 15. Correlación de los resultados obtenidos por FISH, IR y z-score	97
<i>Tabla 16. Resumen de los resultados obtenidos mediante MLPA, IR y z-score Correlación entre los resultados obtenidos mediante MLPA y los métodos de detección de CNVs mediante NGS, IR y z-score.</i>	<i>97</i>
Tabla 17. Correlación de los resultados obtenidos mediante el panel FoundationOne CDx, IR y z-score	98
Tabla 18. Estudio de concurrencia de las alteraciones en los genes A vs B.....	100
Tabla 19. Frecuencia de alteraciones detectadas en la serie estudiada con el panel GLIO-NGS-30 y en la de la serie de GB PanCancerAtlas (TCGA).....	101
Tabla 20. Resumen de las características clínicas de los 157 pacientes incluidos en el estudio comparativo entre LTS y Non-LTS	102
<i>Tabla 21. Resumen datos clínicos de las series LTS vs Non-LTS</i>	<i>103</i>

Tabla 22. Resumen de los datos clínicos de localización, resección y sintomatología al diagnóstico	103
Tabla 23. Mediana de supervivencia global en función del tipo de resección	105
Tabla 24. Resumen de los datos de tratamiento recibido por los pacientes.....	106
Tabla 25. Resumen genes alterados en cada grupo de supervivencia LTS y Non-LTS	108
Tabla 26. Datos de supervivencia global (SG) en función del gen alterado en Glioblastomas IDH-no mutados	112
Tabla 27. Comparativa de datos clínicos entre la serie aquí estudiada y la del TCGA.....	114
Tabla 28. Frecuencia de genes alterados entre la serie del TCGA en función del grupo de supervivencia.	114
Tabla 29. Mediana supervivencia global (meses) en función del gen dentro de la serie de casos del TCGA seleccionados.....	115
Tabla 30. Comparativa de la frecuencia de genes alterados en los casos TCGA IDH no mutado (IDHwt) frente a los de nuestra serie. *Diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) **Fisher test: p<0.0001	111
Tabla 31. Comparativa de la frecuencia de genes alterados en los casos de la serie TCGA IDH no mutado y TP53 alterado frente a la serie estudiada.....	124
<i>Tabla 32. Genes incluidos en el panel GLIO-NGS-30 para el estudio en rutina diagnóstica de gliomas.</i>	<i>130</i>

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADN (M)	ADN metilado (del inglés, <i>Methylated</i>)
ADN (UM)	ADN no metilado (del inglés, <i>Unmethylated</i>)
ALT	del inglés, <i>Alternative Lengthening of Telomeres</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosil tri-fosfato
bp	del inglés, <i>base pair</i>
CBTRUS	del inglés, <i>Central Brain Tumor Registry of the United States</i>
CGH	del inglés, <i>Comparative Genome Hybridisation</i>
CNV	del inglés, <i>Copy Number Variation</i>
COSMIC	del inglés, <i>Catalogue of Somatic Mutations in Cancer</i>
dNTP	dideoxy-nucleotidos
FDA	del inglés, <i>Food and Drug Administration</i>
FFPE	del inglés, <i>Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded</i>
FISH	del inglés, <i>Fluorescence in Situ Hybridisation</i>
GB	Glioblastoma
GB-CG	Glioblastoma con células gigantes
GB-IDHwt	del inglés, <i>Glioblastoma IDH wild type</i>
IHQ	Inmunohistoquímica
INDEL	Inserción-Delección
IR	<i>Ion Reporter</i>
ISP	del inglés, <i>Ion Sphere Particles</i>
KM	Kaplan-Meier
KPS	Índice de Karnofsky
LOH	del inglés, <i>Loss of Heterozygosity</i>
LTS	del inglés, <i>Long-Term Survival</i>
Mb	del inglés, <i>Megabase</i>
MLPA	del inglés, <i>Multiplex Ligation dependent Probe Amplification</i>
MSI	del inglés, <i>microsatellite instability</i>

NEC	del inglés, <i>Not Elsewhere Classified</i> .
NGS	del inglés, <i>Next Generation Sequencing</i>
Non-LTS	del inglés, <i>Non- Long-Term Survival</i>
NOS	del inglés, <i>Not Otherwise Specified</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	del inglés, <i>Polymerase Chain Reaction</i>
RT	Radioterapia
SG	Supervivencia global
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	del inglés, <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SNV	del inglés, <i>Single Nucleotide Variation</i>
TCGA	del inglés, <i>The Cancer Genome Atlas</i>
TML	del inglés, <i>Tumor Mutation Load</i>
TMZ	Temozolomida

RESUMEN

INTRODUCCION

Los tumores primarios del Sistema Nervioso Central (SNC) constituyen alrededor de un 2% de todas las neoplasias en el adulto. Dentro de estos tumores, los gliomas constituyen más de un 60%, siendo el glioblastoma (GB) el tumor más maligno y frecuente con una supervivencia media de 15-18 meses.

Clásicamente, la Organización Mundial de la Salud ha ido estableciendo una serie de criterios histopatológicos para el diagnóstico y la clasificación de los tumores del SNC. En los últimos años, gracias al avance de las tecnologías de secuenciación masiva y a la mejora en el conocimiento de las alteraciones genéticas implicadas en la biología de estos tumores, la nueva clasificación integra los factores moleculares en el diagnóstico de los tumores del SNC.

Por el contrario, los avances en cuanto al tratamiento de estos tumores, y en concreto el del GB, han sido escasos o nulos en la última década. Desde 2005, el tratamiento del GB sigue siendo el mismo, basándose en la cirugía, quimioterapia y radioterapia. Sin embargo, aun siendo el GB un tumor de mal pronóstico, existe un pequeño porcentaje de pacientes que consigue una supervivencia mayor de 2 años.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Esta Tesis Doctoral parte de la hipótesis de la existencia de pacientes con GB cuyas supervivencias globales son mayores a la media sugiriendo la existencia de diferencias entre estos tumores que podrían deberse, entre otros factores, a diferencias en el tumor a nivel genético. En este sentido, las mutaciones en los genes que codifican para la enzima isocitrato deshidrogenasa (IDH1 e IDH2) así como la metilación del promotor del gen *MGMT* son bien conocidos como factores de buen pronóstico en GB. Aun así, una fracción de pacientes sin estos factores moleculares de buen pronóstico presentan supervivencias largas.

Mediante la presente Tesis Doctoral se pretende analizar las diferencias a nivel clínico, histológico y genético entre los pacientes de GB con supervivencias largas (mayores de 3 años, grupo LTS) y aquellos con supervivencias dentro de la media en GB (grupo Non-LTS). Se pretende identificar las características clínicas, histológicas y moleculares que se asocian a un mejor pronóstico en el GB de larga supervivencia y en el subtipo de GB con células gigantes (GB-GC).

MATERIAL Y METODOS

Se extrajo ADN tumoral de 183 muestras de GB y se aplicaron técnicas de secuenciación masiva (NGS) utilizando un panel de diseño propio de 30 genes con el fin de cubrir aquellas vías alteradas con mayor frecuencia en gliomas e importantes para el diagnóstico de estos tumores.

Para este estudio se seleccionaron pacientes de GB de manera prospectiva (años 2015-2019) y de forma retrospectiva aquellos con largas supervivencias y GBs con presencia de células gigantes (1998-2005). Se incluyeron 39 pacientes de larga

supervivencia (superior a 36 meses, LTS), que se compararon con 118 pacientes con SG inferior a 36 meses (Non-LTS). Para el estudio de GB-CG se seleccionaron 36 pacientes.

RESULTADOS

Se utilizó la tecnología de secuenciación masiva con el panel GLIO-NGS-30 para clasificar y estudiar los pacientes con gliomas en base a sus características moleculares. La comparación de los resultados obtenidos mediante NGS y los resultados moleculares obtenidos mediante otras tecnologías, permitieron corroborar la idoneidad del contenido incluido en el panel para el estudio de gliomas, así como su alta especificidad y sensibilidad en la detección de las alteraciones moleculares de estos tumores (SNPs, INDELS y CNVs).

A nivel clínico, dentro del grupo LTS, hemos encontrado un mayor porcentaje de pacientes con menos de 60 años frente a los pacientes incluidos en el grupo Non-LTS (74% vs 44%), con una mediana de edad de 51 y 62 años respectivamente. Por otro lado, aquellos pacientes incluidos en el grupo LTS tuvieron cirugías extensas, con la extirpación de más de un 85% del tumor, mientras que aquellos pacientes incluidos en el grupo Non-LTS tuvieron cirugías menos agresivas con extirpación parcial del tumor o biopsia del tejido tumoral. Atendiendo a la sintomatología en el diagnóstico, dentro de aquellos pacientes del grupo LTS encontramos un mayor porcentaje de pacientes que debutaron con crisis epilépticas (37%). Sin embargo, dentro del grupo Non-LTS la sintomatología más frecuente fue la cefalea (30%).

El análisis mediante NGS reveló que el 28% de los pacientes LTS presentaron mutaciones en los genes *IDH1/2* frente al 1% dentro del grupo Non-LTS, presentando aquellos pacientes con alteraciones en *IDH1/2* mejores supervivencias globales frente al resto (50 meses frente a 17, respectivamente).

Al analizar aquellos casos sin alteraciones en genes *drivers* como *IDH1/2*, *BRAF* e histonas (*H3F3A* y *HIST2H3B*) (“GB-IDH no mutados”). Pacientes con alteraciones en *PTEN* presentan mejores supervivencias globales frente al resto (24 vs 16 meses, respectivamente) mientras que alteraciones en el promotor de *TERT*, *CDKN2A* y *PIK3CA* se dan en mayor frecuencia en pacientes incluidos en el grupo Non-LTS asociándose la alteración de estos genes a una peor supervivencia global.

Los resultados obtenidos del análisis de NGS destacan un pequeño grupo de pacientes dentro de nuestra serie (7 casos), con alteraciones en los genes implicados en la remodelación de la cromatina, *ATRX* y *DAXX*, sin alteraciones en otros genes comúnmente concurrentes como son *IDH1/2* o *H3F3A*, y con mejores supervivencias. La reevaluación de la histología de estos pacientes reveló en 6 de ellos la presencia de células gigantes multinucleadas en al menos un 20% de las células tumorales. Este resultado, nos llevó a la realización de un sub-estudio adicional de pacientes con GB en cuya histología se pudiera detectar la presencia de células gigantes multinucleadas y sin mutaciones en genes *driver* concurrentes como *IDH1/2* o *H3F3A*.

El análisis histológico de los tumores incluidos en este sub-estudio (36 casos) reveló que el 50% de los pacientes presentaba más de un 30% de células gigantes multinucleadas en su histología. Todos los casos incluidos presentaron alteraciones

en TP53. El 73% de los casos con alteraciones en *ATRX* presentaron más de un 30% de células gigantes multinucleadas, frente al 4% de alteraciones en el promotor de *TERT*.

Analizando la supervivencia global de aquellos tumores con células gigantes multinucleadas en más de un 30% presentaron mejores supervivencias frente al resto (21 meses frente a casi 14).

Los resultados obtenidos se validaron mediante el análisis análogo al realizado en la presente Tesis Doctoral de los datos moleculares y clínicos de 536 pacientes con GB publicados dentro del proyecto TGCA (The Cancer Genome Atlas).

CONCLUSIONES

Nuestros resultados confirman la existencia de diferencias que contribuyen a una mejor supervivencia de aquellos pacientes con GB sin mutaciones en IDH que han de ser analizadas con mayor detenimiento en series mayores de GB y con análisis más avanzados. Pacientes más jóvenes presentan mejores supervivencias globales al igual que aquellos a los que se les practica resecciones quirúrgicas más extensas del tumor o aquellos que debutan con crisis epilépticas. Mutaciones en *IDH1/2* y *PTEN* se asocian a mejor pronóstico dentro de nuestra serie y por el contrario mutaciones en el promotor de *TERT*, *PIK3CA* y deleciones de *CDKN2A* se asocian a peor pronóstico.

Finalmente, los resultados obtenidos en el análisis GB con células gigantes confirman las diferencias existentes entre estos y el GB “clásico” cuanto, a supervivencia y alteraciones moleculares, caracterizándose por ser tumores con más frecuencia de alteraciones en p53, *ATRX* y menor frecuencia de alteraciones en *EGFR* o *CDKN2A*.

ABSTRACT

INTRODUCTION

Primary tumours of the central nervous system (CNS) constitute about 2% of all neoplasms in adults. Among these tumours, gliomas account for more than 60%, with glioblastoma (GB) being the most malignant and frequent tumour with a median survival of 15-18 months.

Classically, the World Health Organisation has established a series of histopathological criteria for the diagnosis and classification of CNS tumours. In recent years, thanks to advances in mass sequencing technologies and improved knowledge of the genetic alterations involved in the biology of these tumours, the new classification integrates molecular factors into the diagnosis of CNS tumours.

In contrast, there has been little or no progress in the treatment of these tumours, particularly GB, in the last decade. Since 2005, the treatment of GB has remained the same, based on surgery, chemotherapy and radiotherapy. However, even though GB is a tumour with a poor prognosis, there is a small percentage of patients who achieve a survival of more than 2 years.

HYPOTHESIS AND OBJECTIVES

This Doctoral Thesis is based on the hypothesis of the existence of patients with GB whose overall survival rates are higher than average, suggesting the existence of differences between these tumours that could be due, among other factors, to differences in the tumour at the genetic level. In this sense, mutations in the genes coding for the enzyme isocitrate dehydrogenase (*IDH1* and *IDH2*) as well as *MGMT* gene promoter methylation are well known as good prognostic factors in GB. However, a fraction of patients without these molecular prognostic factors have long survival times.

This doctoral thesis aims to analyse the clinical, histological, and genetic differences between GB patients with long survival times (greater than 3 years, LTS group) and those with average survival times in GB (Non-LTS group). The aim is to identify the clinical, histological and molecular characteristics that are associated with a better prognosis in long-surviving GB and in the GB subtype with giant cells (GB-GC).

MATERIAL AND METHODS

Tumour DNA was extracted from 183 GB samples and Next Generation Sequencing (NGS) were applied using an in-house designed panel of 30 genes to cover those pathways most frequently altered in gliomas and important for the diagnosis of these tumours.

For this study, GB patients were selected prospectively (years 2015-2019) and retrospectively those with long survival and GBs with presence of giant cells (1998-2005). Thirty-nine patients with long survival (greater than 36 months, LTS) were

included and compared with 118 patients with OS less than 36 months (Non-LTS). Thirty-six patients were selected for the GB-CG study.

RESULTS

Next-Generation-Sequencing technology with the GLIO-NGS-30 panel was used to classify and study patients with gliomas based on their molecular characteristics. Comparison of the results obtained using NGS and the molecular results obtained using other technologies corroborated the suitability of the content included in the panel for the study of gliomas, as well as its high specificity and sensitivity in the detection of the molecular alterations of these tumours (SNPs, INDELS and CNVs).

At the clinical level, within the LTS group, we found a higher percentage of patients under 60 years of age compared to patients included in the Non-LTS group (74% vs 44%), with a median age of 51 and 62 years respectively. On the other hand, those patients included in the LTS group had extensive surgeries, with the removal of more than 85% of the tumour, while those patients included in the Non-LTS group had less aggressive surgeries with partial removal of the tumour or biopsy of the tumour tissue. In terms of symptomatology at diagnosis, a higher percentage of patients in the LTS group had seizures (37%). However, in the Non-LTS group, the most frequent symptomatology was headache (30%).

NGS analysis revealed that 28% of LTS patients had mutations in *IDH1/2* genes versus 1% in the Non-LTS group, with those patients with *IDH1/2* alterations having better overall survival rates than the rest (50 months versus 17 months, respectively).

When analysing those cases without alterations in driver genes such as *IDH1/2*, *BRAF* and histones (*H3F3A* and *HIST2H3B*) ("non-mutated GB-IDH"). Patients with alterations in *PTEN* have better overall survival than the rest (24 vs. 16 months, respectively) while alterations in the *TERT* promoter, *CDKN2A* and *PIK3CA* occur more frequently in patients included in the Non-LTS group, with alterations in these genes being associated with worse overall survival.

The results obtained from the NGS analysis highlight a small group of patients in our series (7 cases) with alterations in the genes involved in chromatin remodelling, *ATRX* and *DAXX*, without alterations in other common concurrent genes such as *IDH1/2* or *H3F3A*, and with better survival rates than the rest (30 months). Re-evaluation of the histology of these patients revealed in 6 of them the presence of multinucleated giant cells in at least 20% of the tumour cells. This result prompted us to perform an additional sub-study of GB patients whose histology could detect the presence of multinucleated giant cells and without mutations in concurrent driver genes such as *IDH1/2* or *H3F3A*.

Histological analysis of the tumours included in this sub-study (36 cases) revealed that 50% of the patients had more than 30% multinucleated giant cells in their histology. All cases included had *TP53* alterations. Of the cases with *ATRX* alterations, 73% had more than 30% multinucleated giant cells, compared to 4% with alterations in the *TERT* promoter.

Analysing the overall survival of those tumours with multinucleated giant cells in more than 30% showed better survival compared to the rest (21 months vs. almost 14 months).

The results obtained were validated by analysing the molecular and clinical data of 536 patients with GB published in the TCGA (The Cancer Genome Atlas) project in a similar way to the one carried out in this doctoral thesis.

CONCLUSIONS

Our results confirm the existence of differences that contribute to better survival in patients with GB without IDH mutations that need to be further analysed in larger series of GBs and with more advanced analyses. Younger patients have better overall survival as do those who undergo more extensive surgical resection of the tumour or those who debut with epileptic seizures. Mutations in *IDH1/2* and *PTEN* are associated with better prognosis in our series, while mutations in the *TERT* promoter, *PIK3CA* and *CDKN2A* deletions are associated with worse prognosis.

Finally, the results obtained in the GB analysis with giant cells confirm the existing differences between these and the "classic" GB in terms of survival and molecular alterations, characterised by tumours with a higher frequency of alterations in p53, *ATRX* and a lower frequency of alterations in *EGFR* or *CDKN2A*.

LIMITACIONES

Este trabajo presenta una serie de limitaciones. En primer lugar, la baja SG media del GB (15-18 meses) imposibilita recoger pacientes con larga supervivencia dentro del periodo de realización de esta Tesis Doctoral, por lo que para este análisis se han tenido que buscar pacientes de manera retrospectiva a efectos de conseguir una serie representativa de pacientes con larga supervivencia, con el consiguiente riesgo de incluir un sesgo en el estudio.

Además, esto implica que el ADN obtenido de estas muestras retrospectivas pueda estar más fragmentado o generar más artefactos en la secuenciación debido a la fijación del tejido en parafina. Esta limitación se ha tratado de minimizar empleando criterios estrictos de análisis de resultados genómicos y su validación.

En segundo lugar, en los últimos años, el conocimiento acerca de las alteraciones genéticas que subyacen al GB ha evolucionado de forma importante. De esta manera, el diseño del panel de NGS (GLIO-NGS-30) debería actualizarse para incorporar el análisis de alteraciones como las mutaciones en el promotor de *TERT*, las ganancias y pérdidas del cromosoma 7 y 10, respectivamente, o las deleciones del gen *PTEN*.

Por último, se han analizado los genes alterados con mayor frecuencia dentro del GB y con mayor implicación clínica en estos tumores. Sin embargo, cabría tener en cuenta la posibilidad de la existencia de alteraciones en otros genes a nivel genómico, transcriptómico o de proteína que pudieran ser relevantes en la supervivencia y que no se han considerado en el presente trabajo.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LOS TUMORES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

1.1. Epidemiología

Los tumores primarios del Sistema Nervioso Central (SNC) constituyen alrededor del 2% del total de las neoplasias del adulto y son responsables del 2.5% de las muertes por cáncer, según el último informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS) del año 2020, siendo la tasa de incidencia de 3.5 nuevos casos por cada 100.000 habitantes/año en el mundo y la tasa de mortalidad de 2.8 casos por cada 100.000 habitantes/año (*Global Cancer Observatory, International Agency for Research on Cancer, OMS*) (Figura 1).

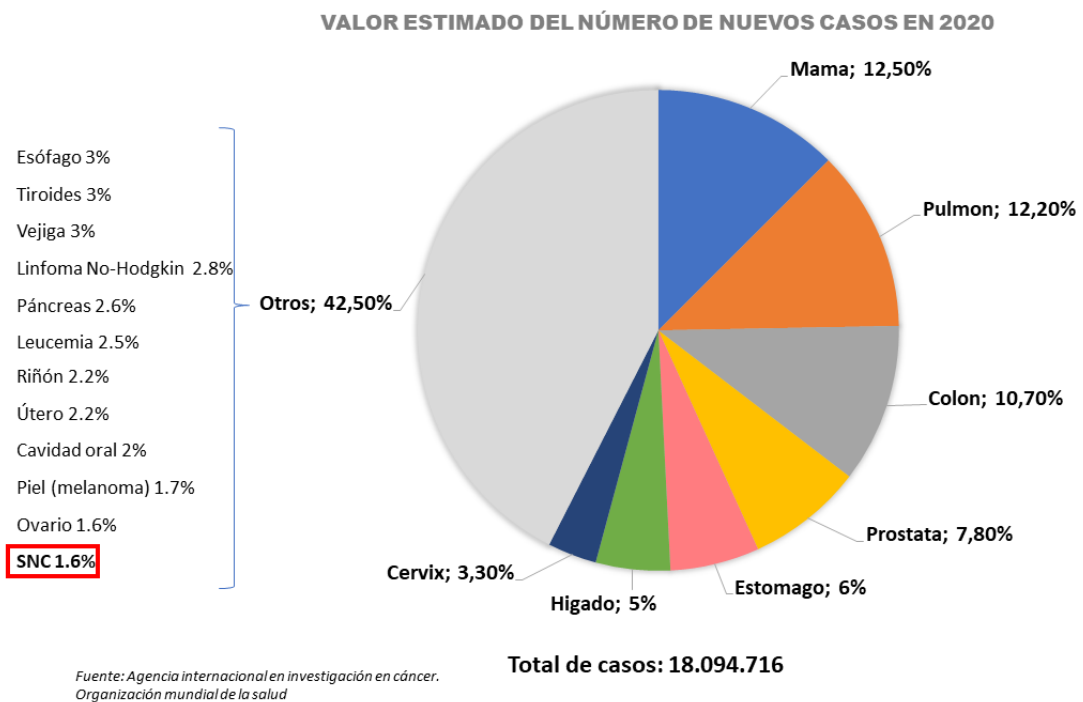


Figura 1. Datos de nuevos casos de cáncer al año. Figura adaptada del informe de la Organización Mundial de la Salud de 2020. <https://gco.iarc.fr/today/home>.

En España, los tumores primarios del SNC representan un 2% del total del cáncer en adultos, con aproximadamente 4.400 nuevos casos diagnosticados en el último año (2021) [1]. Se calcula una incidencia de 8.73 nuevos casos por cada 100.000 habitantes/año en varones y 5.41 casos en mujeres. Con respecto a la incidencia en función de la edad, se observa el primer pico de incidencia en la infancia, y un segundo pico a partir de la tercera década de vida. Este último con un máximo en los 54 años para el conjunto de tumores del SNC y en los 62 años para el glioblastoma (GB) y el meningioma.

La tasa de mortalidad en España fue de 6 por 100.000 habitantes en hombres, mientras que en mujeres fue de 4 por 100.000 habitantes, siendo responsable del 3% de las muertes por cáncer en el último año en España [1,2] (Figura 2).

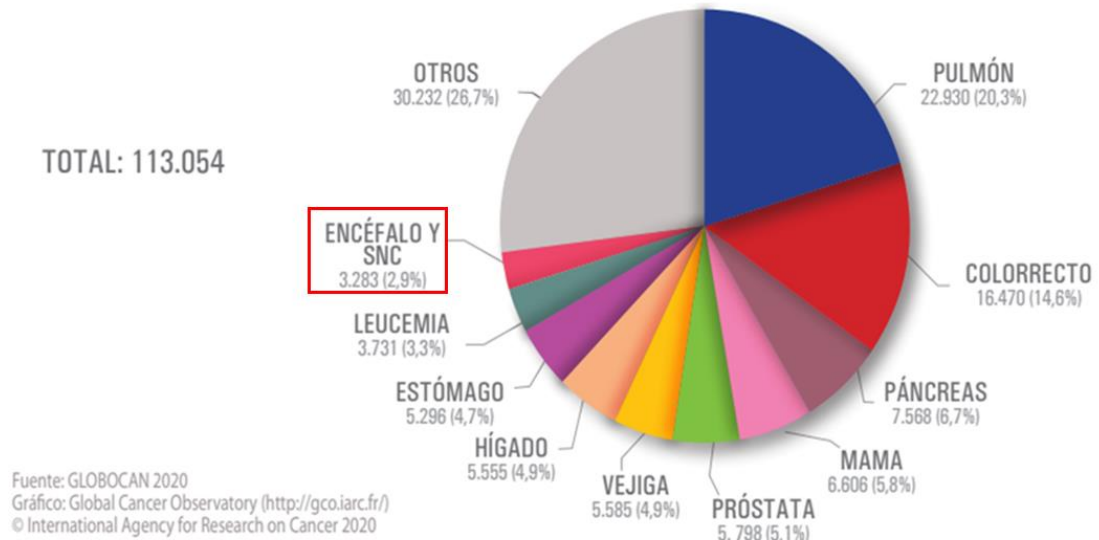


Figura 2. Tipos de cáncer responsables de la mayor mortalidad en España. Estimación para el año 2020 (ambos sexos). Figura obtenida del informe de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) de 2021. www.seom.org

Dentro de los tumores del SNC, los tumores primarios más frecuentes son los gliomas (más de un 60% del total), formando un grupo heterogéneo de neoplasias con múltiples tipos histológicos y grados de malignidad.

En base a los últimos datos arrojados por el registro de tumores del Sistema Nervioso de Estados Unidos (años 2012-2016) (*Central Brain Tumor Registry of the United States, CBTRUS*) [3], el 30.2% de los tumores del SNC diagnosticados son malignos, mientras que el 69.8% de los tumores son benignos. Dentro de los tumores malignos diagnosticados, el más frecuente es el GB (48.3%) (Figura 3).

Así pues, a pesar de ser un conjunto de tumores poco frecuentes con una baja incidencia con respecto al resto de tipos de tumores, los tumores del SNC suponen un importante problema de salud debido a su alta tasa de mortalidad, siendo una enfermedad de mal pronóstico.

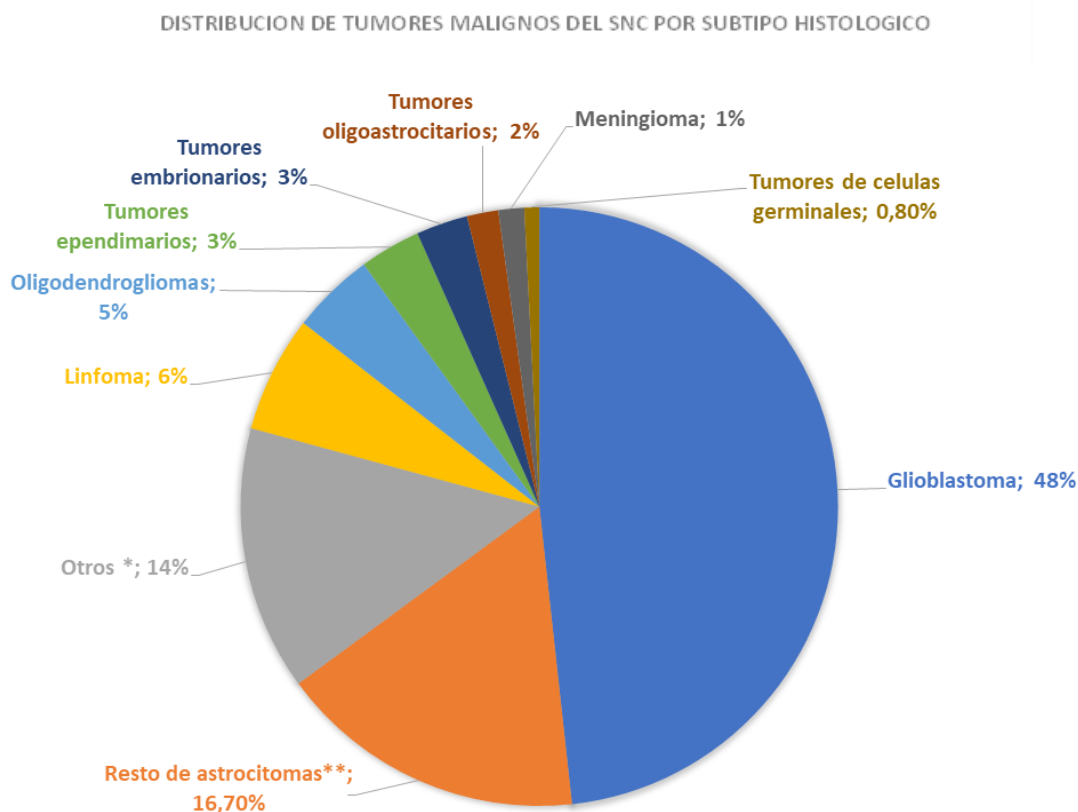


Figura 3. Distribución de tumores del SNC por subtipo histológico. Total: 122.569 casos (5 años); media de 24.514 casos por año. Figura adaptada de Ostrom et al. CBTRUS Statistical Report [3]. *Incluye gliomas malignos Not Otherwise Specified (NOS), tumores de plexo coroideo, otros tumores neuroepiteliales, tumores neuronales y gliales-neuronales mixtos, tumores de la región pineal, otros tumores craneales y espinales, tumores mesenquimales, lesiones melanocíticas, otras neoplasias relacionadas con las meninges, neoplasias hematopoyéticas, hemangioma. **Incluye el astrocitoma pilocítico, astrocitoma difuso, astrocitoma anaplásico y variantes del astrocitoma.

1.2. Características histopatológicas y clínicas del glioblastoma

EL GB es el tumor cerebral primario más frecuente y agresivo; supone el 60-75% de los tumores astrocitarios.

Histológicamente se caracteriza por una población heterogénea de células neoplásicas de morfología astrocitaria de aspecto fibrilar con atipia nuclear, pleomorfismo y elevada actividad mitótica, núcleos irregulares e hiper cromáticos, presencia de proliferación microvascular y/o la presencia de necrosis (Figura 4). Esta necrosis puede presentarse como una necrosis en pseudoempalizada, con un centro necrótico rodeado de mayor densidad de células neoplásicas [4] (Figura 4).

A nivel inmunohistoquímico, el GB presenta positividad para la proteína glial fibrilar ácida (GFAP) y OLIG2. El índice de proliferación celular, Ki67, es positivo, habitualmente en torno a un 20% de las células [5].

Tradicionalmente se ha hablado de GB primario y secundario, diferenciando aquellos GB cuya primera manifestación es ya un tumor de grado 4 (primario), de aquellos que se originan tras la progresión de un tumor de menor grado (secundario).

Sin embargo, a raíz de los recientes hallazgos moleculares, esta diferenciación no está aconsejada actualmente por la nueva clasificación de la OMS de 2021 [15].

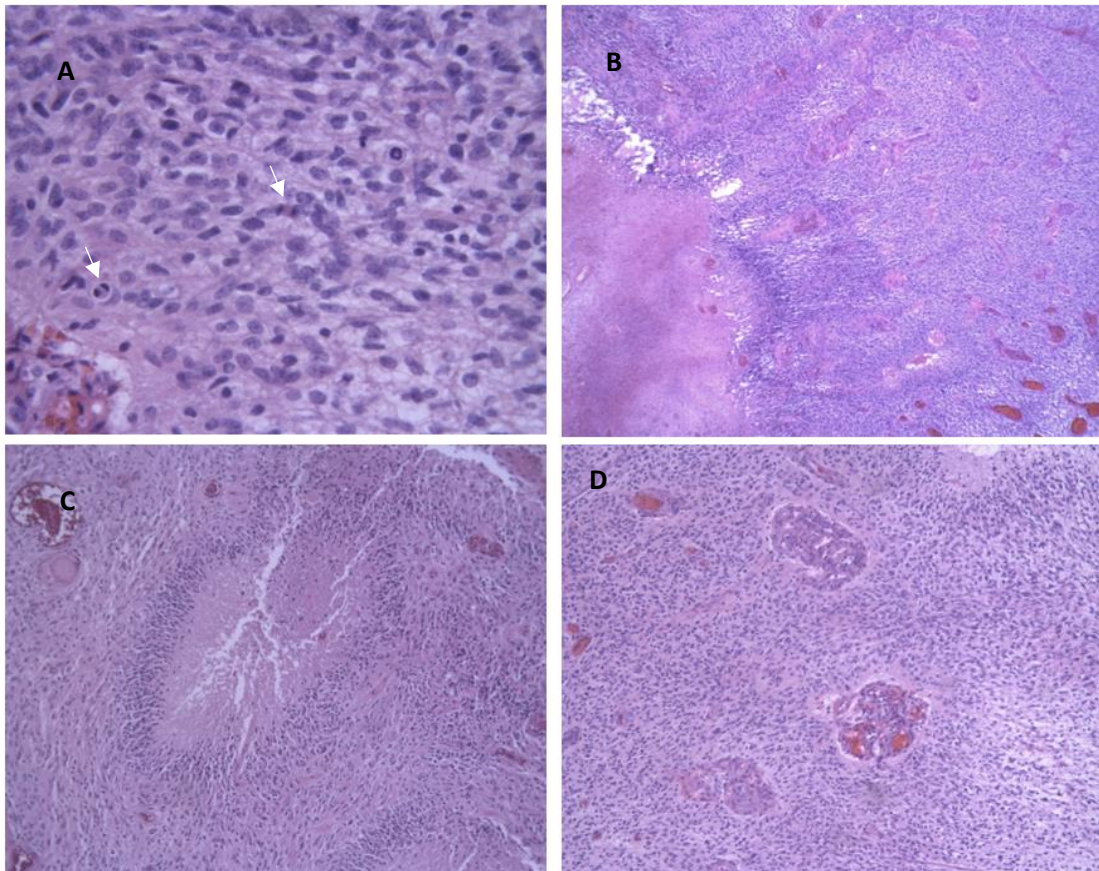


Figura 4. Microfotografías de cortes de tejido tumoral de GB teñidos con Hematoxilina-Eosina. A) Se muestran células neoplásicas de morfología astrocitaria de aspecto fibrilar con atipia nuclear, pleomorfismo y elevada actividad mitótica (flechas). Imagen tomada a 400 aumentos. B) Se observa necrosis empalizada y proliferación microvascular. Imagen tomada a 25 aumentos. C) Necrosis en empalizada en tejido tumoral de GB. Imagen tomada a 100 aumentos. D) Se muestran numerosas zonas con proliferación microvascular. Imagen tomada a 100 aumentos.

La presentación clínica del GB varía en función de la localización de la lesión, presentándose frecuentemente en lóbulo temporal, frontal y parietal [6]. Los GB-IDHwt (GB-IDH no mutados) afectan 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 con una mediana de edad de 69 años. La relación hombre/mujer es de 1.6 [3]. En aquellos casos de GB-IDH mutado (actualmente denominado astrocitoma IDH mutado grado 4, según se comentará en apartado 3) la edad mediana de presentación está en torno a los 44 años, y la relación hombre/mujer es de 1.05 [7].

Los síntomas más frecuentes de inicio de la enfermedad son crisis epilépticas, alteraciones en el comportamiento, alteraciones motoras y otros síntomas derivados del aumento de presión intracraneal [8].

1.3. Pronóstico, tratamiento y supervivencia del GB

Dentro de los factores pronósticos considerados en los gliomas, se encuentran el tipo y grado histológico, las alteraciones genéticas y moleculares, el estado funcional (índice de Karnofsky), la edad y la presencia de tumor residual tras la cirugía [2].

- Estado funcional: Se mide con el índice de Karnofsky (KPS) y hace referencia a la capacidad del paciente para hacer una vida más o menos independiente en cuanto a sus actividades básicas de la vida diaria (cuanto menor es el KPS menos capacidad de realizar tareas diarias). En función del índice KPS el impacto frente a ciertos tratamientos puede variar de manera que se trata de un factor importante en la toma de decisiones de tratamiento. A menor KPS, peor pronóstico.
- Edad: De manera general, cuanto más jóvenes mejor pronóstico.
- Tipo y grado histológico: Es de gran importancia la clasificación tumoral, establecer el tipo histológico y el grado de malignidad para predecir un pronóstico adecuado y establecer un tratamiento. Como se ha mencionado con anterioridad, el GB presenta un grado de malignidad elevado (grado 4) presentando un peor pronóstico frente a otros tipos de tumores gliales infiltrantes.
- Alteraciones genéticas y moleculares: Además del tipo histológico y grado de malignidad, en los últimos años el conocimiento de los factores genéticos que subyacen al GB es fundamental para establecer un diagnóstico preciso y, aunque de momento no existan tratamientos individuales basados en las alteraciones moleculares del tumor, sí son factores pronósticos. Por ejemplo, la mutación en IDH constituye un factor pronóstico favorable, mientras que las alteraciones en el promotor del gen *TERT* en el GB suponen un factor pronóstico desfavorable.
- Tumor residual tras la cirugía: La resección quirúrgica amplia (la más extensa posible conservando la función neurológica) se ha relacionado con una mayor supervivencia frente a una extirpación parcial o una biopsia del tumor, como se expone en diferentes trabajos [9, 10].

En cuanto al tratamiento del GB, hoy en día se trata mediante cirugía con la máxima resección posible del tumor seguido del tratamiento estándar, el cual desde el año 2005 consiste en radioterapia (RT) con temozolomida (TMZ) concomitante y adyuvante [11, 12]. En aquellos tumores en los que no es posible su resección, generalmente se aconseja la toma de una muestra mediante biopsia con el fin de establecer un diagnóstico histológico y molecular definitivo del tumor [13].

La TMZ es un agente alquilante cuyo mecanismo de acción consiste en la capacidad que tienen los metabolitos del fármaco MTIC (monometil-triazenoimidazol-carboxamida) en metilar el ADN, mayoritariamente en las bases guanina. Como resultado de esta metilación, se produce la degradación del ADN y apoptosis celular al no poder actuar el mecanismo de reparación del ADN (Figura 5) [14].

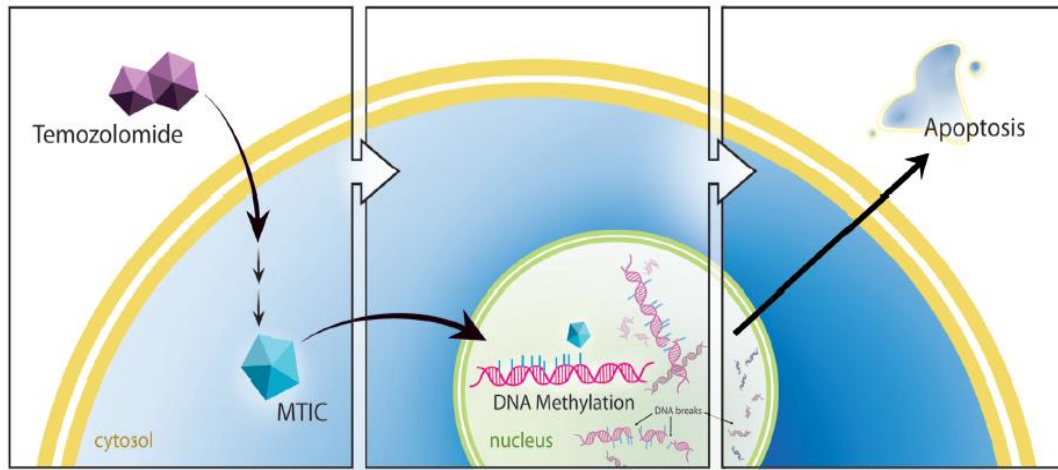


Figura 5. Mecanismo de acción del fármaco Temozolomida. Figura obtenida de Wesolowski et al. 2010 [14].

En el momento actual, el GB se considera un tumor incurable, y a pesar de los avances en cuanto al conocimiento de la biología de estos tumores, se han producido pocas mejoras con respecto a su tratamiento, manteniéndose el mismo esquema desde el año 2005.

De la misma forma, tampoco se han producido mejoras en cuanto a la supervivencia global, siendo la supervivencia media de los pacientes con GB de 15-18 meses tras tratamiento estándar [15]. Sin embargo, una pequeña proporción de pacientes, entre el 2 y 8%, viven más de dos años, y menos del 3% viven más de 5 años [3, 4, 16, 17]. A estos pacientes se les denominan largos supervivientes.

Se han estudiado numerosos factores que pueden estar asociados a la larga supervivencia de los pacientes con GB, como son la edad, el volumen tumoral, la localización unilateral o bilateral del tumor, el tamaño de la resección o el tratamiento adyuvante [18]. Sin embargo, con respecto a las alteraciones moleculares, todavía no se han determinado cuáles son los factores asociados a esta larga supervivencia de los pacientes. Se ha descrito que un menor índice de proliferación Ki67, la metilación del promotor de *MGMT*, las mutaciones en *IDH*, la ausencia de amplificación de *EGFR* y la ausencia de mutaciones del promotor de *TERT* se asocian a mejor pronóstico, pero las características histopatológicas y moleculares que se asociación a la larga supervivencia de los pacientes no están del todo establecidas [19, 20, 21].

2. ALTERACIONES MOLECULARES EN GLIOMAS DIFUSOS

En los últimos años se ha producido un gran avance en el conocimiento de las alteraciones genéticas de los tumores gliales, propiciado fundamentalmente por los avances en las nuevas tecnologías, y en particular, por las técnicas de secuenciación masiva.

2.1. Mutación de los genes *IDH1/IDH2* (IDH)

En 2008 se publicó por primera vez la identificación de mutaciones en el gen *IDH1* (*Isocitrato deshidrogenasa 1*) en el GB [22]. En este trabajo, el 12% de los GB analizados presentaron una mutación recurrente en *IDH1*, mayoritariamente en pacientes jóvenes con GB secundarios, que se asociaba con un mayor tiempo de supervivencia.

Estudios posteriores detectaron que las mutaciones en *IDH1* se encuentran en mayor frecuencia en gliomas difusos de bajo grado (grados 2 y 3) (63-88%) y GB antes llamados secundarios (76-82%), mientras que la frecuencia en GB (previamente llamados primarios) es mínima (5-7%) [23].

Dentro de las mutaciones que pueden darse en *IDH1*, la mutación más frecuente descrita en gliomas se produce en el codón 132 (c.395G>A, R132H), presente en el 90% de los gliomas con mutaciones en *IDH1* [23]. En gliomas, se han descrito con menor frecuencia otras mutaciones en el mismo codón: R132C (3.6–4.6%), R132G (0.6–3.8%), R132S (0.8–2.5%) y R132L (0.5–4.4%) [2, 3, 4].

Por otro lado, aunque menos frecuente, también se han identificado mutaciones en la proteína homóloga, *IDH2*, y de igual manera éstas se asocian a pacientes jóvenes y con mejor supervivencia. Las mutaciones en el gen *IDH2* se dan con mayor frecuencia en tumores de estirpe oligodendrogial (5%), mientras que en tumores astrocitarios la frecuencia de mutaciones en *IDH2* es prácticamente nula [24].

Las mutaciones en el gen *IDH2* se localizan en el codón 172, análogo al codón 132 de *IDH1*, siendo la variante R172K la más frecuente [25]. Las mutaciones en *IDH1* e *IDH2* son excluyentes [26].

IDH es una proteína con actividad enzimática implicada en el metabolismo del citrato. Las mutaciones en los genes *IDH1* e *IDH2* producen una ganancia de función de la proteína que genera la sobreproducción del oncometabolito 2-hidroxiglutarato (2HG). Como consecuencia de esta sobreproducción se produce una desregulación celular que induce la hipermetilación del ADN, incluyendo la metilación de regiones promotoras de genes importantes en diferenciación celular, silenciando su expresión. Como consecuencia, se produce un incremento en la tumorigénesis celular y una autorrenovación celular [27] (Figura 6).

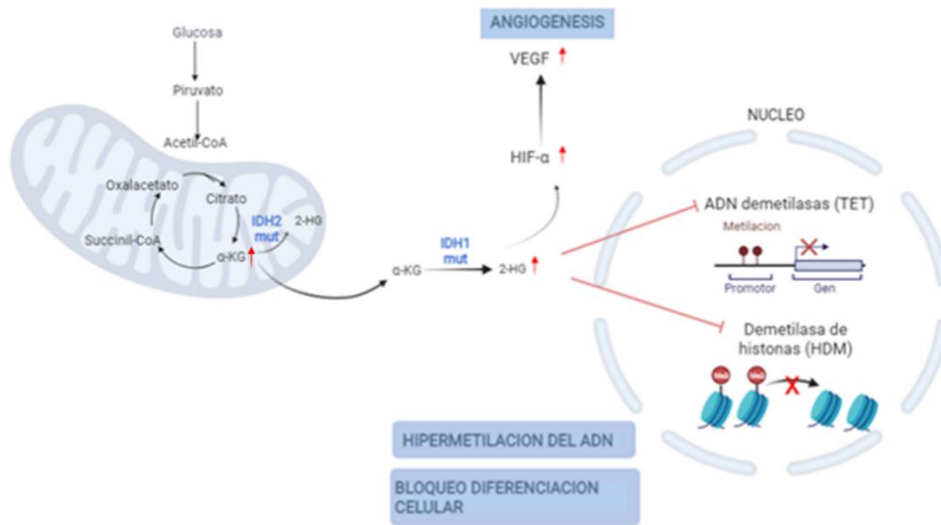


Figura 6. Esquema de la alteración del metabolismo en células con mutaciones en IDH. El incremento en la producción de 2HG, como consecuencia de la ganancia de función de IDH1 actúa como inhibidor competitivo de enzimas dependientes de α -cetoglutarato (α KG). El incremento en 2HG produce un incremento en el nivel de metilación del ADN por inhibición de las enzimas que actúan en la demetilación del ADN (TET citosina hidrolasas y las histon-lisina-demetilasas). El oncometabolito 2HG produce además un incremento de HIF1- α como consecuencia de la inhibición de enzimas HIF hidroxilasas, lo que supone un incremento en la angiogénesis como consecuencia del incremento del factor de crecimiento endotelial VEGF. Figura adaptada de Waitkus M et al. [29]

Tras la publicación de 2008, en la que se describían por primera vez mutaciones en *IDH1* en GB, se publica al año siguiente un estudio en una de las primeras grandes series en la que se describen mutaciones en *IDH1* y en su gen homólogo *IDH2* en tumores del SNC (Figura 7).

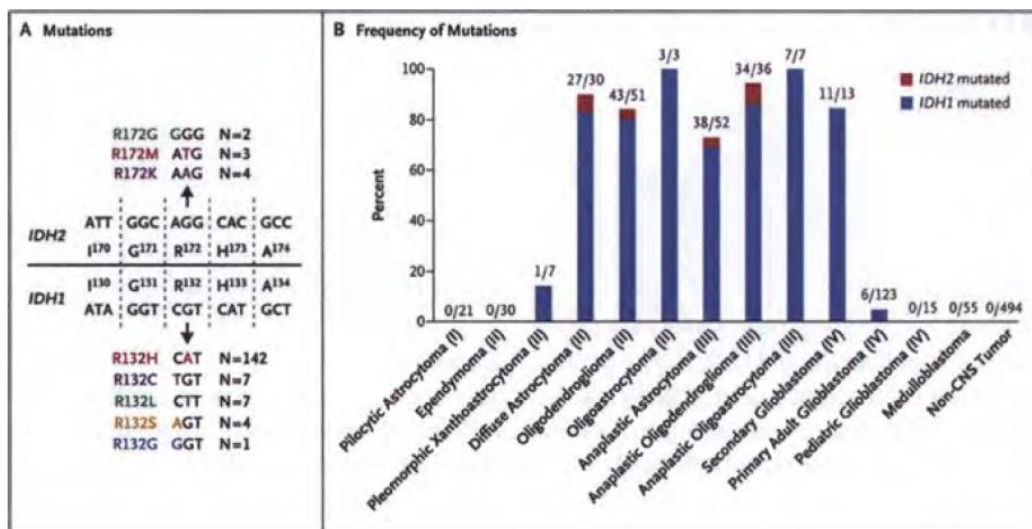


Figura 7. Mutaciones detectadas en *IDH1* e *IDH2* y la frecuencia observada de estas mutaciones en tumores del SNC. Figura obtenida del estudio de Yang et al. [28].

2.2. Alteraciones en genes implicados en el mantenimiento de los telómeros

Los telómeros son regiones que contienen secuencias repetitivas de ADN y que se encuentran en los extremos de los cromosomas. Estas regiones tienen una secuencia específica de nucleótidos, TTAGGG, que es reconocida como el final del cromosoma.

La función principal de los telómeros es la de mantener la estabilidad estructural de los cromosomas. Cada vez que una célula se divide, los telómeros se vuelven más cortos. A medida que se producen los ciclos de división celular, los telómeros se van acortando hasta alcanzar una longitud crítica que hace que la célula entre en un punto de senescencia en el que ya no puede dividirse más, llevándola a la apoptosis. De esta manera, los telómeros actúan como señal de límite de división celular, con el fin de no perder parte del ADN cromosómico importante para el funcionamiento celular en cada ciclo si la célula siguiera dividiéndose. Este es así un mecanismo de protección celular frente a la adquisición de mutaciones, deleciones o reordenamientos cromosómicos que pudieran resultar en un proceso oncogénico como consecuencia de los numerosos ciclos de división celular [30, 32, 33, 34] (Figura 8).

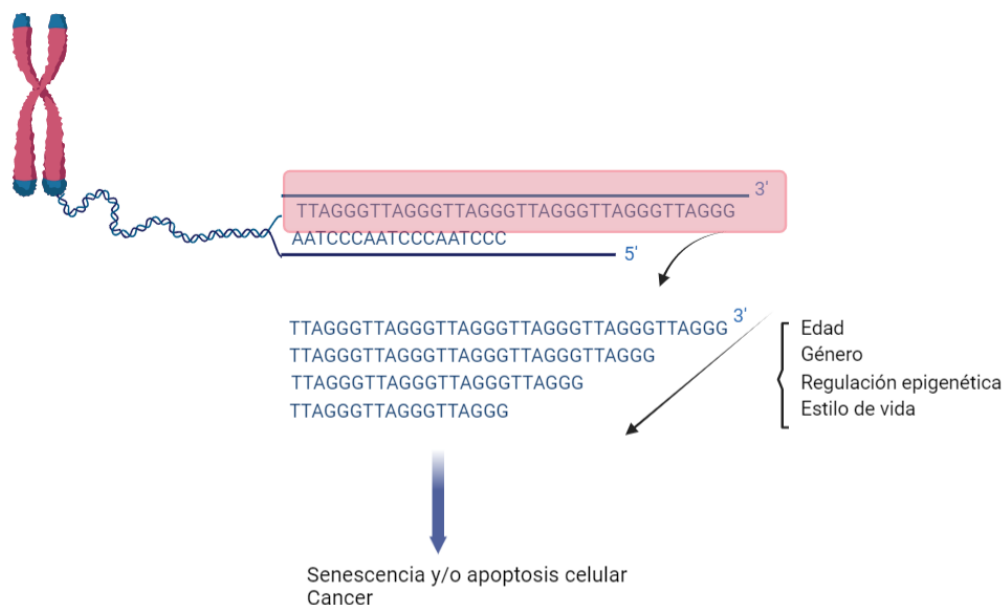


Figura 8. Factores que afectan al acortamiento de telómeros. Los telómeros se acortan en cada ciclo de división celular progresivamente debido a la replicación incompleta del ADN hasta alcanzar un punto crítico en el que la célula entra en senescencia o apoptosis, o bien en un proceso tumoral. Figura adaptada de Fan et al. [31]

El estudio sobre el mecanismo del mantenimiento de la longitud de los telómeros ha supuesto un gran avance en el conocimiento del proceso tumoral. Se ha descrito que en las células tumorales la longitud de los telómeros se mantiene, no produciéndose el acortamiento de éstos como consecuencia de diferentes procesos como pueden ser la edad, el estilo de vida, la regulación epigenética, etc. Como consecuencia de este mantenimiento en la longitud de los telómeros, la célula no

entra en fase de apoptosis y/o senescencia y, de esta manera, la célula puede auto dividirse de manera infinita, siendo ésta una de las características principales de las células cancerosas [33].

- Mutaciones en el promotor del gen *TERT* (*pTERT*)

El gen *TERT* (*Telomerase reverse transcriptase*), localizado en el cromosoma 5p15.33, codifica para la subunidad catalítica de la telomerasa, TERT, la cual es esencial para la replicación y extensión de los telómeros. La actividad de TERT se inactiva en las células adultas mediante represión de la transcripción del gen [35, 36, 37].

La reactivación de TERT mediante la regulación de su expresión es un mecanismo necesario para la transformación de una célula normal en cancerígena. El 90% de los tumores reactivan la expresión de TERT, provocando la sobreexpresión de la proteína y en consecuencia un incremento en su actividad que conlleva al mantenimiento de la longitud de los telómeros y la inmortalidad celular [39] (Figura 9).

En relación con la activación de la telomerasa, se han descrito tanto mutaciones en el promotor del gen *TERT* (*pTERT*), como variaciones en el patrón de metilación de su región promotora [40], siendo el mecanismo de activación mediante mutaciones el más frecuente. De las mutaciones descritas, se han identificado dos específicas (*hotspot*) en el promotor del gen: c.-124C>T en la posición chr5:1,295,250 (hg19) (C250T) y c.-146C>T en chr5:1,295,228 (hg19) (C228T). Estas mutaciones son mutuamente excluyentes [40].

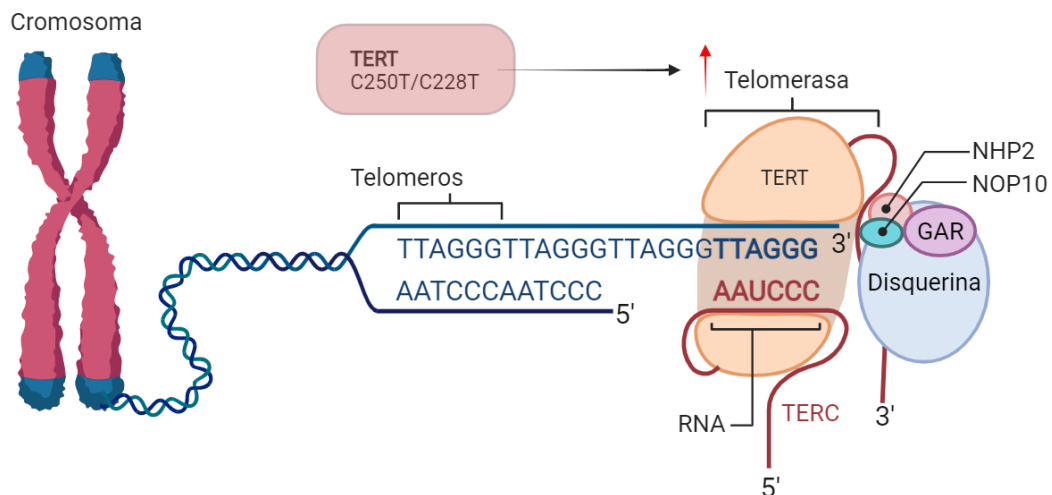


Figura 9. Mecanismo de acción de TERT. Figura adaptada de Killela et al. [38].

Diferentes estudios sobre el *status* mutacional del promotor de *TERT* en gliomas han demostrado que el oligodendroglioma presenta frecuentemente mutaciones en el promotor de *TERT* (75%-97%) [41, 42, 43, 44]. Por otro lado, dentro de los astrocitomas, el GB IDH-no mutado es el tumor con mayor frecuencia de

mutaciones en *pTERT*, variando entre el 50 y el 87% según los estudios [41, 42, 43, 44], y siendo la mutación C228T la más frecuente en los GBs (en torno al 75% de los casos).

Se ha descrito que aquellos pacientes de gliomas con mutaciones en IDH y *pTERT* muestran mejores supervivencias que aquellos que presentan sólo IDH mutado [46], siendo el 96.3% de estos casos pacientes con tumores oligodendrogiales que presentan la co-deleción de 1p/19q, un factor de buen pronóstico. Sin embargo, en los GBs, IDH-no mutados, las mutaciones en *pTERT* se asocian a peor pronóstico [44].

- Alteraciones en ATRX

Aunque la reactivación de la telomerasa TERT sea el mecanismo más común descrito en el mantenimiento de la longitud de los telómeros, se ha descrito otro mecanismo independiente de telomerasa para el mantenimiento de la longitud telomérica, conocido como alargamiento telomérico alternativo (ALT, del inglés *Alternative Lengthening of Telomeres*) [45,46].

El gen *ATRX* (*α-Thalassemia/mental retardation-syndrome-X-linked*) codifica para una proteína que conforma una de las subunidades del complejo remodelador de cromatina. ATRX junto con DAXX, otra proteína implicada en el complejo remodelador de cromatina, se encargan de la incorporación de la histona H3.3 en la cromatina y los telómeros. De esta manera, se modula la activación o represión transcripcional, manteniendo la estabilidad genómica [47].

Las alteraciones en estas proteínas interrumpen el ensamblaje de nucleosomas teloméricos mediados por la histona H3.3, desencadenando un proceso de descompactación de los telómeros que acaba con la pérdida de función de la replicación telomérica. Así, las células activan la vía de reparación del ADN, ALT, como mecanismo alternativo para el mantenimiento de la longitud de los telómeros. Como consecuencia de esta activación se produce una recombinación homóloga y copia de secuencias teloméricas completas de un cromosoma a otro sin afectar a la longitud o la integridad de la secuencia copiada. De esta forma, se mantiene la longitud telomérica y la célula entra en un estado de inmortalidad (Figura 10) [48].

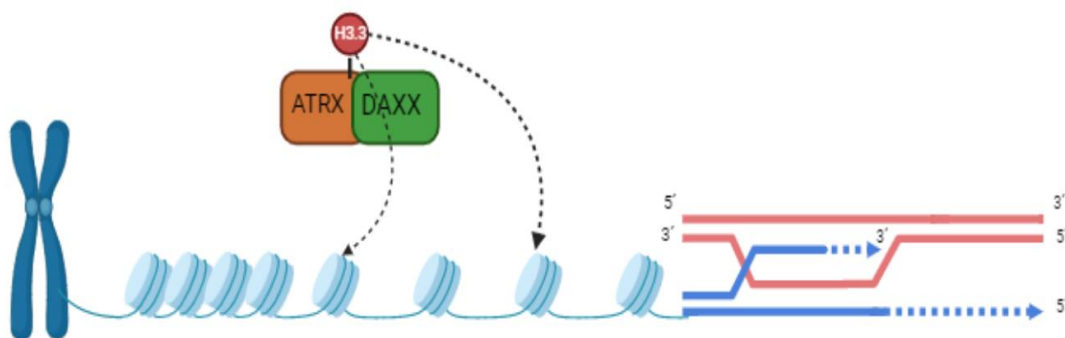


Figura 10. Mecanismo de acción del complejo ATRX/DAXX. Figura adaptada de Haberler C et al [48].

En gliomas, las alteraciones en ATRX se encuentran en tumores astrocitarios asociadas a mutaciones en IDH [49], siendo las alteraciones en el gen *ATRX* causantes de una disminución en la producción de proteína. Las alteraciones que se producen en el gen pueden producirse a lo largo de toda su secuencia, por lo que en la rutina diagnóstica el estudio de *ATRX* se realiza mediante estudio de la expresión de la proteína por inmunohistoquímica [49].

2.3. Principales alteraciones de las vías de señalización en el GB

En 2008, gracias al programa TCGA (del inglés, *The Cancer Genome Atlas*), se realizó el estudio de las características genómicas y transcriptómicas de 206 GBs. Este estudio reveló que las vías de señalización más importantes alteradas en el GB son la vía de p53, la vía de retinoblastoma Rb y la vía RTK (receptor tirosin kinasa) /RAS/PI3K (fosfatidilinositol 3 kinasa). Dentro de cada una de estas vías hay diferentes genes alterados con diferentes frecuencias y tipo de alteraciones [52].

Estos datos se ampliaron en 2013 con el estudio de 543 GBs por parte del grupo de trabajo del TCGA liderado por el Dr. Brennan. En dicho estudio se confirmaron los resultados previos obtenidos en cuanto a la definición de las principales vías de señalización alteradas en GB, la frecuencia de alteraciones de los diferentes genes implicados y el tipo de alteraciones encontradas [53] (Figura 11).

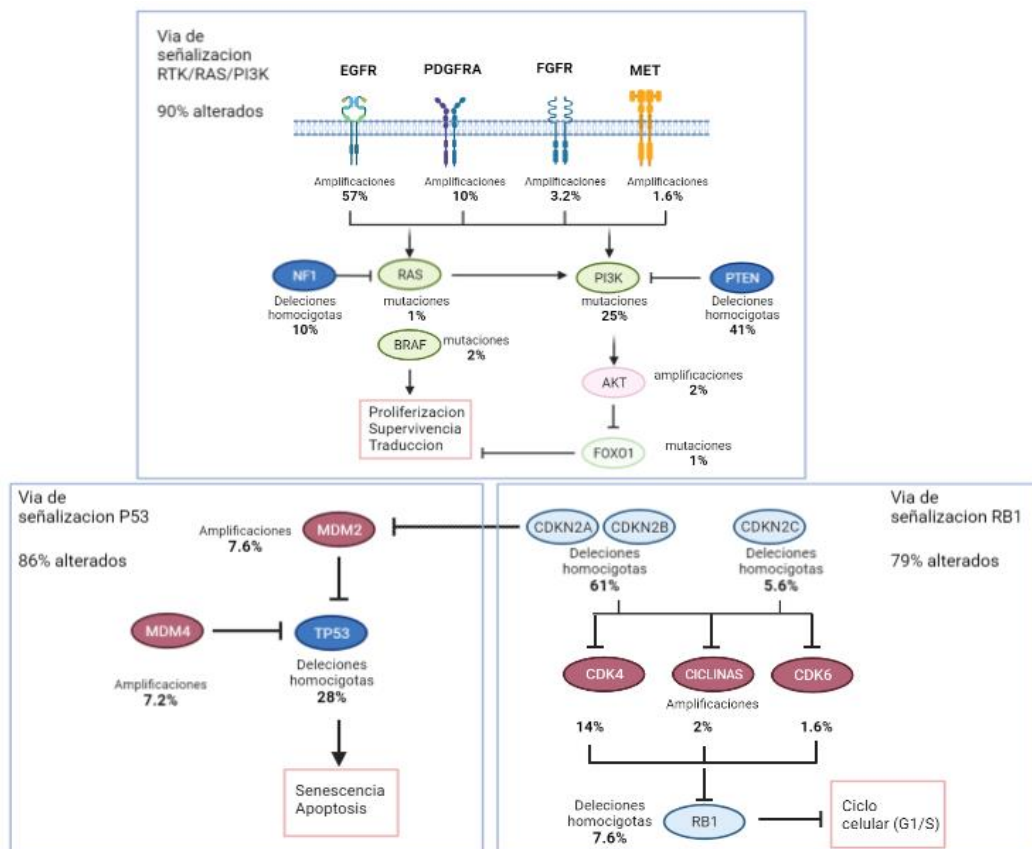


Figura 11. Frecuencia y tipos de alteraciones detectadas en los diferentes genes de las principales vías de señalización alteradas en GB. Figura adaptada de Brennan et al. 2013 [53] y The Cancer Genome Atlas (TCGA) Research Network, 2008 [4].

Como se observa en la figura anterior, la vía de p53 se encuentra alterada en un 85% de los tumores a través de mutaciones o deleciones del gen *TP53* (28%), o de alteraciones en algunos de los genes inactivadores de p53, como son las amplificaciones de los genes *MDM1/2/4* (15%) y deleciones de genes represores como *CDKN2A* (58%). Los resultados del grupo TCGA demostraron que las alteraciones de *TP53* eran excluyentes con aquellas amplificaciones en los genes de la familia MDM y las deleciones de *CDKN2A*. Con respecto a la vía de retinoblastoma (RB), el 79% de los tumores tienen al menos una alteración en los genes implicados en dicha vía. El 8% de los casos tienen mutaciones/deleciones del gen *RB1*, el 15% amplificaciones de *CDK4/6* y el resto deleciones de *CDKN2A*.

Con respecto a la vía RTK/RAS/PI3K, el 90% de los casos presentan alteraciones en alguno de los genes implicados en esta vía. El 67% de los GBs tienen alteraciones en algún gen codificante de alguno de los receptores *tirosin kinasa*, siendo la más frecuente la amplificación del gen *EGFR* (57.4%), que promueve la división y migración celular bloqueando la apoptosis [54, 55]. El 13% de los casos presentan amplificaciones/mutaciones del gen *PDGFRA*, aproximadamente un 2% amplificaciones del gen *MET* y, en menor frecuencia (3%), amplificaciones de *FGFR2/3*.

Las mutaciones en los genes que codifican para las subunidades catalíticas de la proteína PI3K, *PIK3R1* y *PIK3CA*, se encuentran en un 25.1% de los GBs, y son mutuamente excluyentes con las mutaciones/deleciones del gen *PTEN*. *PTEN* regula los niveles de PIP3 (fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato) a través de la inhibición de la vía de señalización AKT. La alteración de *PTEN* provoca el cúmulo de PIP3 en el citoplasma, provocando la activación permanente de la vía AKT. Por último, un 10% de los GBs tienen deleciones en el gen *NF1* y un 2% mutaciones en el gen *BRAF*.

2.4. Metilación del promotor del gen *MGMT* en el glioblastoma

La metilación del ADN consiste en la incorporación de un grupo metilo (CH₃) en la posición 5' de las citosinas que preceden a guaninas (dinucleótido CG). Esta metilación se da frecuentemente en regiones ricas en GCs, las islas CpGs, localizadas mayoritariamente en las regiones promotoras de genes. La metilación de las islas CpGs en los promotores de los genes se asocia al silenciamiento de su transcripción, y se realiza gracias a enzimas ADN metiltransferasas.

El gen *MGMT*, codifica para la proteína reparadora del ADN, O6-metilguanidina-ADN-metiltransferasa, cuya función es el mantenimiento de la integridad del ADN mediante eliminación de grupos metilo. Se trata así de una proteína reparadora de ADN implicada en la defensa frente a mutagénesis y toxicidad producida por agentes alquilantes [56].

El tratamiento estándar en GB incluye la quimioterapia con el agente alquilante TMZ, induciendo así la apoptosis celular. De esta manera, el silenciamiento de la expresión de *MGMT*, cuando el promotor está metilado, implica una inhibición de la reparación del ADN, haciendo a las células más sensibles al tratamiento con agentes alquilantes. De esta manera, el estudio de la metilación del promotor de *MGMT* tiene un valor predictivo de respuesta a tratamiento [57].

3. DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO Y MOLECULAR DE LOS TUMORES GLIALES: CLASIFICACIÓN DE LA ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD

3.1. Generalidades

El diagnóstico histopatológico de los tumores del SNC se basa en la clasificación que establece la OMS, organismo que lidera la clasificación histológica de todas las neoplasias [4, 5]. La OMS publicó la primera clasificación de los tumores del SNC en 1979, sucediéndose tres ediciones más en 1993, 2000 y 2007, así como una actualización en 2016 previa a la clasificación actual de 2021 (5ª Edición) [15]. La mejora en el conocimiento histopatológico y molecular de estos tumores a lo largo del tiempo se ha visto reflejada en los cambios producidos en las sucesivas ediciones. La última versión ha cambiado por completo el proceso de diagnóstico, ya que integra, por primera vez, características histopatológicas y moleculares, mientras que las clasificaciones anteriores se basaban únicamente en criterios morfológicos para definir las entidades.

De manera tradicional, la clasificación histológica de los tumores del SNC se realizaba de acuerdo con el tipo de células gliales a las que más se asemejaba morfológicamente el tumor, clasificándose en tumores astrocitarios, oligodendrogiales o mixtos. Posteriormente, se añadía el grado tumoral al subtipo histológico, aportando así información sobre el comportamiento biológico del tumor, su grado de malignidad.

El grado tumoral en los gliomas es un factor que influye en la elección del tratamiento, pudiendo determinar la necesidad de utilizar tratamientos más o menos agresivos, como radioterapia y/o quimioterapia adyuvante, o incluso el régimen de tratamiento a aplicar. Clásicamente, el grado de malignidad se ha definido en base a criterios histológicos como la presencia de atipia celular, figuras de mitosis, necrosis y/o proliferación microvascular [58]. Sin embargo, recientemente, en la nueva clasificación de 2021, algunas alteraciones moleculares como la mutación de promotor del gen *TERT*, la amplificación del gen *EGFR*, la ganancia del cromosoma 7 junto con la pérdida del cromosoma 10, o la delección en homocigosis del gen *CDKN2A* cobran ahora importancia para la asignación del grado de malignidad [15].

En la actualidad, el patrón infiltrante del tumor respecto al parénquima cerebral adyacente también tiene mayor importancia en la clasificación de los gliomas de 2021, diferenciándose los tumores gliales difusos e infiltrantes (grados de malignidad 2 a 4) de los tumores gliales bien delimitados y circunscritos (generalmente de grado 1).

Los tumores de grado 1 presentan un bajo potencial de proliferación, con posibilidad de curación realizando solamente resección quirúrgica. Sin embargo, los tumores gliales de grado 2, que son infiltrantes a pesar del bajo nivel proliferativo, recurren con frecuencia y tienden a avanzar a grados más altos de malignidad. Los tumores de grado 3 presentan mayor potencial proliferativo, mostrado por la presencia de características histológicas de malignidad (atipia, mitosis), mientras que

los tumores más malignos, de grado 4, presentan atipia celular, pleomorfismo celular, mitosis, proliferación microvascular, necrosis o determinados factores moleculares de mal pronóstico mencionados anteriormente.

Los avances en el conocimiento de las características moleculares de los gliomas en estas dos últimas décadas [59, 60, 61, 62] demostraron que dentro de cada entidad de glioma definida histológicamente existe una importante variabilidad clínica que podía explicarse por factores genéticos subyacentes. Por ello, es en la actualización de la clasificación de la OMS de tumores del SNC de 2016 [5] cuando se incluyen las alteraciones moleculares, además de las características histológicas, con el fin de realizar un diagnóstico “integrado” del tumor que sea aplicable para el diagnóstico, el pronóstico, que tenga un valor predictivo, y que permita así realizar un tratamiento individualizado del paciente. De esta manera, los tumores ya no sólo se definen por su aspecto al microscopio, sino también por las alteraciones moleculares presentes. Por lo tanto, es importante la utilización de biomarcadores moleculares para realizar un diagnóstico más preciso de los gliomas, así como para establecer un pronóstico clínico y un tratamiento personalizado.

En el caso de los gliomas, en la actualización de 2016 se introducen ya marcadores moleculares clínicamente relevantes:

- i) Mutaciones en los genes *IDH1* e *IDH2* (IDH) en astrocitomas difusos, asociadas a pronóstico favorable [63].
- ii) Codelección de los brazos cromosómicos 1p y 19q en tumores de origen oligodendroglial (oligodendrogliomas).
- iii) Pérdida de expresión de la proteína ATRX o mutaciones en el gen *ATRX*, que se asocia a tumores de estirpe astrocitaria.
- iv) Mutaciones en el promotor del gen *TERT*, en GB IDH-no mutados.
- v) Mutaciones en el gen *H3F3A* (K27), que se dan sobre todo en gliomas infantiles y de adultos jóvenes de localización en línea media asociados a un pronóstico desfavorable [60].
- vi) Mutaciones en el gen *BRAF* (V600E), asociados a GB epiteloide o el xantoastrocitoma pleomórfico.
- vii) Metilación del promotor del gen *MGMT*, que se asocia a una mayor respuesta a fármacos alquilantes como la temozolomida [764].

Tras la actualización de 2016, en la nueva clasificación de 2021 destacan los siguientes cambios (Figura 12) [65]:

- i) Todos los astrocitomas difusos IDH-mutados se consideran como un único tipo tumoral, eliminándose así los 3 subtipos diferentes dentro de esta categoría (astrocitoma difuso, el astrocitoma anaplásico o el GB IDH mutado), quedando englobados todos ellos como “astrocitoma IDH-mutado” e incluyendo el grado 2, 3 o 4 en función de los diferentes parámetros histológicos y moleculares.
- ii) El grado de los astrocitomas IDH mutados ya no sólo depende de parámetros histológicos, sino que se incluye el estudio de la delección homocigota de los genes *CDKN2A/B*, de manera que aquellos astrocitomas IDH mutados con delección homocigota de *CDKN2A/B* se clasifican como grado 4, aún en ausencia de proliferación microvascular o necrosis en la histología.

- iii) Para aquellos astrocitomas difusos IDHwt, la detección de mutaciones del promotor del gen *TERT*, la amplificación del gen *EGFR* o la ganancia del cromosoma 7 junto con la pérdida del cromosoma 10 serían suficientes para asignar un grado 4 de malignidad y el diagnóstico de GB-IDHwt.
- iv) Se introduce el término “NEC” para hacer referencia a aquellos tumores cuyas pruebas diagnósticas han sido completadas pero los resultados “no encajan” en alguno de los tipos de tumor establecidos en la nueva clasificación de la OMS, debido a incongruencias entre la clínica, la histología, los estudios inmunohistoquímicos y/o genéticos.
- v) Se mantiene el término “NOS” en el diagnóstico ya introducido en la actualización de la clasificación de la OMS de 2016 para hacer referencia a aquellos tumores cuyo estudio molecular no ha podido completarse.

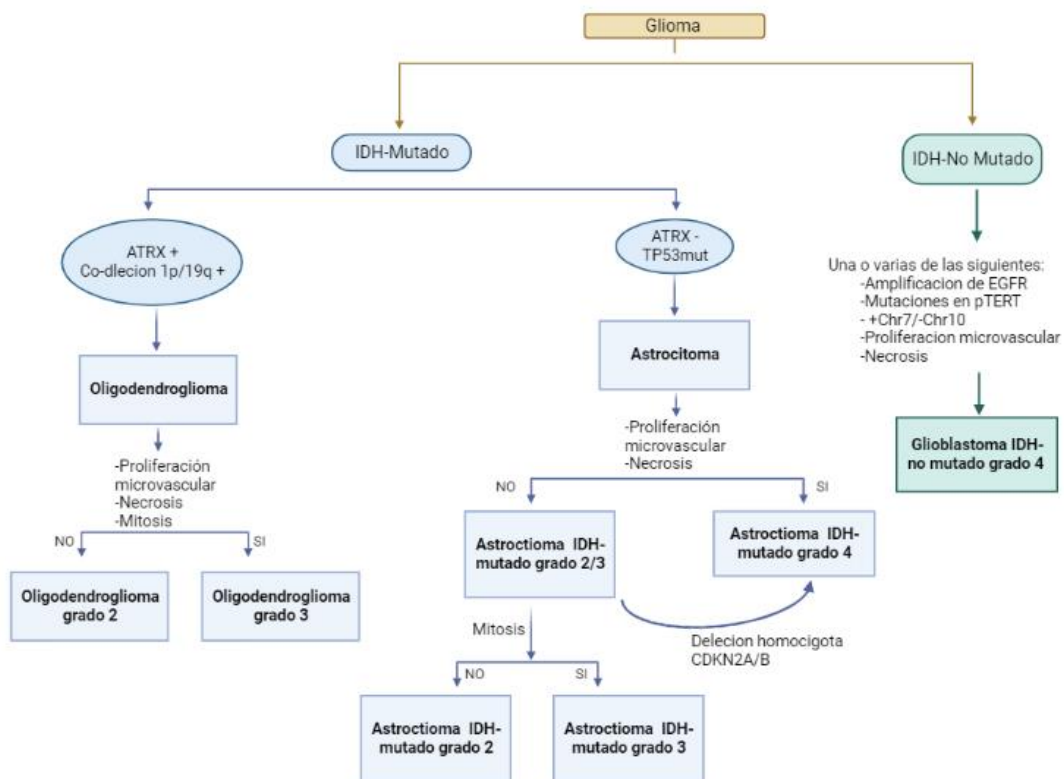


Figura 12. Criterios histológicos y moleculares en el diagnóstico y clasificación de los tumores gliales según la clasificación de la OMS de 2021. ATRX+ hace referencia a la positividad inmunohistoquímica (tinción positiva) de la proteína ATRX. ATRX- hace referencia a la negatividad en cuanto a la tinción inmunohistoquímica (sin tinción en las células tumorales pero positiva en un control interno) y por tanto, pérdida de expresión de la proteína en el tumor.

3.2. El GB en la nueva clasificación de la OMS

Es en la actualización de la OMS 2016 cuando se dividen los GB en dos: GB-IDHmut y GB-IDHwt [3, 5].

Desde el punto de vista molecular, en esta clasificación se establece que el GB-IDHwt puede presentar amplificación de *EGFR*, mutaciones de *PTEN*, mutación del promotor de *TERT* y pérdida del cromosoma 10 [5], mientras que el GB-IDHmut se caracteriza por presentar alteraciones en *TP53* y *ATRX* [8] (Tabla 1).

Tabla 1. Principales características del GB IDHwt y GB IDH mutado. Datos obtenidos de la actualización de 2016 de la clasificación de tumores del SNC [5]

	GB-IDHwt	GB-IDHmut
Diagnóstico clásico	GB primario	GB secundario
% de GB	90%	10%
Mediana de edad al Dx	62 años	44 años
Relación hombre/mujer	1.42/1	1.05/1
Mediana supervivencia	15 meses	31 meses
pTERT	72%	26%
TP53	27%	81%
ATRX	raramente	71%
EGFR (amplificación)	35%	raramente
PTEN	24%	raramente

Sin embargo, tras la actualización de la clasificación de la OMS de los tumores del SNC de 2021, esta estratificación del GB queda eliminada, quedando así una única identidad del GB correspondiente al GB-IDHwt en la que el grado del GB viene definido por la presencia de una o todas las características histológicas y moleculares que se detallan a continuación: proliferación microvascular, presencia de necrosis, amplificación de *EGFR*, mutación del promotor *TERT* o ganancia del cromosoma 7 combinada con la pérdida del cromosoma 10 [63, 66].

Del mismo modo, la denominación de GB-IDHmut desaparece, denominándose ahora Astrocitoma IDH mutado grado 4. Las características histomoleculares de estos tumores vendrán definidas por la presencia de mutaciones en IDH, así como proliferación microvascular, necrosis y delección homocigota del gen *CDKN2A*, siendo suficiente una de estas tres características para la asignación del grado 4 [15].

3.3. Subtipos de GB

La actualización de la OMS de 2016 reconoce tres variantes del GB con características histológicas concretas: el GB epiteloide, el gliosarcoma y el GB de células gigantes (GB-GC). En la clasificación de la OMS de 2021, estas variantes morfológicas pasan a denominarse subtipos con patrones morfológicos celulares bien caracterizados [15].

Dichos subtipos quedan todavía sin definir completamente desde el punto de vista molecular, aun habiendo evidencias de su diferente comportamiento clínico con respecto al GB IDH-no mutado como en el caso del GB-GC [67].

3.3.1. GB de células gigantes

El GB de células gigantes (GB-CG) representa menos del 1% de los GB. Este subtipo se caracteriza histológicamente por un componente mayoritario de células gigantes multinucleadas y pleomórficas, un componente de células astrocitarias de menor tamaño fusiformes, y frecuentemente presentan una rica trama de fibras de reticulina (Figura 13). Las células gigantes pueden llegar a medir 0.5mm de diámetro y contener más de 20 núcleos. La presencia de necrosis en empalizada o zonas de necrosis isquémica es frecuente, mientras que la proliferación microvascular no es tan frecuente.

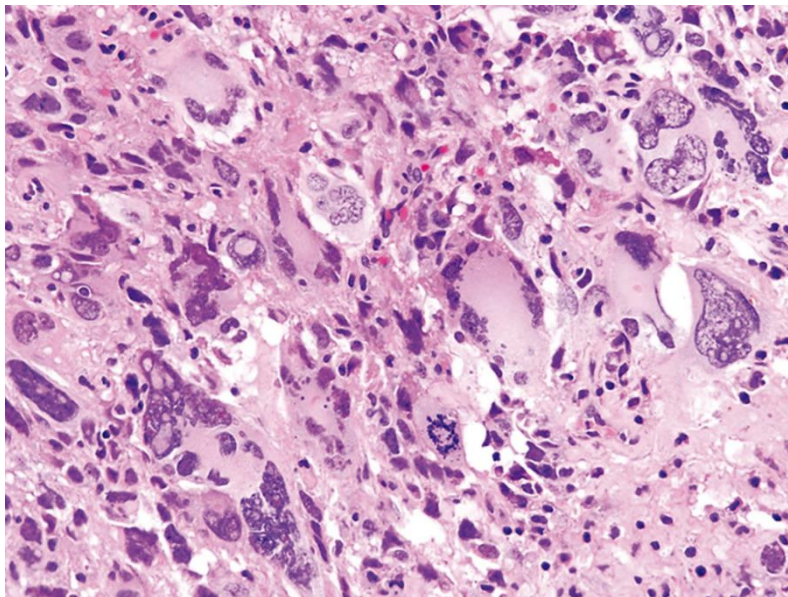


Figura 13. Imagen histológica de un GB de células gigantes. Tinción con hematoxilina-eosina en el que se visualizan células gigantes multinucleadas. Foto obtenida del libro de la OMS 2021 [15].

Se trata de tumores que radiológicamente se encuentran bien delimitados, se localizan en la mayoría de los casos en los lóbulos temporales o parietales y se suelen dar en pacientes más jóvenes (media de 51 años) [15]. Según algunos estudios, el

pronóstico del GB-GC puede ser ligeramente mejor que el del GB convencional [67, 68].

Molecularmente, el GB-CG no queda definido por un patrón molecular propio, si bien se sabe que presentan ausencia de mutaciones de IDH, alta tasa de mutaciones en *TP53* y *PTEN*, baja frecuencia de amplificaciones de *EGFR* [72], así como elevada inestabilidad genómica con defecto en los mecanismos de reparación del DNA como consecuencia de mutaciones en *POLE* o en los genes reparadores del ADN [15]. Por ello, pueden mostrar pérdida de expresión de algunas de las proteínas reparadoras de ADN, lo cual puede detectarse mediante inmunohistoquímica.

3.2.2. Gliosarcoma

El gliosarcoma representa un 2% del total de los GBs y puede manifestarse *de novo* o tras tratamiento con radioterapia en la recurrencia. Histológicamente se caracteriza por un patrón de crecimiento bifásico celular con un componente glial y un componente mesenquimal, ambos de naturaleza maligna [69].

El componente glial muestra positividad para GFAP y OLIG2, mientras que en el componente mesenquimal muestra un incremento de tinción con reticulina y son negativos para GFAP y OLIG2 [15].

Estos tumores son, radiológicamente, bien delimitados, y se dan en lóbulos temporales [70]. Existen estudios que evidencian un mejor pronóstico de estos tumores frente al GB [71], aunque la mayoría no encuentran diferencias en la supervivencia de los pacientes.

Molecularmente, se trata de GB-IDHwt con menor frecuencia de metilación del promotor de *MGMT* y amplificación de *EGFR* [72,73]. Se caracterizan por mutaciones en los genes *PTEN*, *TP53*, el promotor de *TERT*, ganancias del cromosoma 7 y pérdidas del 10, así como deleciones de *CDKN2A*, co-amplificación de *CDK4* y *MDM2* [5,15].

3.2.3. GB epiteloide

EL GB epiteloide se introduce por primera vez en la actualización de la OMS de 2016. Se trata de un glioma difuso de alto grado (con actividad mitótica, necrosis y proliferación microvascular) que está caracterizado por una población tumoral uniforme, con células eipiteloides no cohesivas. Estas células tienen un límite bien definido, citoplasma eosinófilo, escasas prolongaciones y núcleo excéntrico [5].

En cuanto al pronóstico, los pacientes con GB epiteloide tienen peor pronóstico que aquellos con otro tipo de GB (supervivencia media 6.3 meses) [5].

Desde el punto de vista molecular, el 50% de los casos de GB epiteloide presentan la mutación V600E del gen *BRAF* [74]. En algunos casos de GB epiteloide también presentan amplificación de *EGFR*, deleción de *CDKN2A* y pérdida de *PTEN* [75].

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

El glioblastoma es el tumor más agresivo dentro de los tumores primarios del SNC, con una supervivencia media de 15-18 meses. Es conocida la asociación con mejor pronóstico de los pacientes con mutaciones de IDH, así como la metilación del promotor de *MGMT*. Aun así, un porcentaje de pacientes con supervivencias mayores a 2 años no presentan alteraciones en estos genes, sugiriendo así que otros factores genéticos podrían estar implicados en este mejor pronóstico.

La hipótesis que se plantea en esta Tesis Doctoral es si el análisis exhaustivo y simultáneo de las alteraciones moleculares más frecuentes en los gliomas mediante secuenciación masiva permitiría conocer si existen otras alteraciones genéticas asociadas a los pacientes con glioblastoma que tienen larga supervivencia, así como la caracterización molecular de los GB con células gigantes.

OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es el estudio de los factores genéticos implicados en el GB mediante el empleo de un panel de secuenciación masiva dirigido al estudio de los gliomas y su correlación con las características histopatológicas y clínicas de los pacientes. De esta manera, se pretende identificar y analizar biomarcadores que pudieran ser útiles en el establecimiento del diagnóstico, pronóstico y tratamiento de los pacientes con GB.

Los objetivos concretos de esta Tesis Doctoral son los siguientes:

1. Diseño y validación de un panel de genes para el estudio mediante secuenciación masiva de tumores gliales que permita el análisis de SNV, INDEL y CNV.
2. Análisis de las características clínicas de pacientes con GB con larga supervivencia.
3. Caracterización molecular de tumores gliales mediante secuenciación masiva. Análisis de biomarcadores relacionados con el pronóstico.
4. Correlación de datos histológicos y moleculares de gliomas con larga supervivencia.
5. Caracterización molecular de GBs con células gigantes mediante secuenciación masiva.
6. Correlación de datos clínicos, histológicos y moleculares de pacientes de GBs con células gigantes con el fin de establecer parámetros histológicos que definan este subtipo de GB.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL

4.1. Pacientes seleccionados

En el presente estudio se incluyeron un total de 183 pacientes. Se trata de un estudio descriptivo, prospectivo y retrospectivo, de una serie de casos con diagnóstico de glioblastoma (GB) procedentes del Hospital Universitario 12 de octubre (Madrid) y del Hospital Virgen de la Salud (Toledo). Este estudio cuenta con el dictamen favorable de los Comités Ético y de Investigación del Hospital Universitario 12 de octubre CEIC 14/023 y del Hospital Virgen de la Salud (242 del 28/03/2018).

El diagnóstico de los tumores recogidos de manera prospectiva se realizó en cada hospital siguiendo criterios basados en la actualización de la clasificación de la OMS de tumores de Sistema Nervioso Central en el año 2016 [5]. Dado que algunos tumores recogidos de manera retrospectiva fueron diagnosticados en base a la clasificación de la OMS de tumores de Sistema Nervioso Central de 2007 o anteriores [4], se realizó la reevaluación histológica de estos tumores siguiendo los criterios de la actualización de 2016.

Debido a la aparición de la nueva clasificación de la OMS de los tumores del SNC en el año 2021, todos los tumores se reclasificaron posteriormente según la clasificación de 2021, pero se debe resaltar que para la selección de casos de GB de esta Tesis Doctoral se siguieron los criterios de la actualización de la OMS publicada en 2016. Así pues, el grado 4 de malignidad de los casos seleccionados en esta Tesis se estableció únicamente en base a criterios histológicos (necrosis y/o proliferación vascular), sin tener en cuenta los criterios moleculares que actualmente están vigentes en la recién publicada quinta edición de la clasificación de tumores del SNC de la OMS 2021 (amplificación *EGFR*, mutación del promotor de *TERT*, ganancia cromosoma 7/pérdida del 10). Asimismo, interesa resaltar que no se excluyeron casos de GB con mutaciones de IDH o en la histona H3, que actualmente en la clasificación de 2021 serían diagnosticados como Astrocitoma, IDH mutado, grado 4, Glioma difuso de línea media, H3 K27-alterado, o glioma difuso hemisférico, H3 G34-mutado.

De manera prospectiva, se recogieron todos los pacientes intervenidos de un tumor cerebral (primera cirugía) y diagnóstico de GB, entre los años 2015 y 2019 cuya muestra, datos clínicos y consentimiento informado firmado estuviesen disponibles en cada uno de los centros (74 casos). Para la realización de esta Tesis Doctoral, se decidió no incluir pacientes con diagnóstico posterior a septiembre de 2019, de manera que el periodo de seguimiento fuese lo suficientemente largo para determinar la evolución clínica de los casos incluidos.

De manera retrospectiva, se incluyeron casos diagnosticados de GB entre los años 1998 y 2015 que tuvieran una supervivencia larga y cuya muestra de tejido y la

mayor parte de los datos clínicos estuviesen disponibles en cada uno de los centros (109).

Para el análisis de los factores relacionados con la supervivencia larga de los pacientes, éstos se dividieron en dos grupos en función de la supervivencia global (SG): aquellos pacientes con supervivencia mayor o igual a 36 meses se clasificaron como pacientes de larga supervivencia, LTS (*Long Term Survival*), y aquellos con supervivencia menor a 36 meses se clasificaron como pacientes sin supervivencia larga, Non-LTS (*Non-Long Term Survival*).

El valor de 36 meses para diferenciar estos dos grupos de pacientes LTS y Non-LTS se eligió en base a los siguientes criterios:

1. Una supervivencia de 36 representa una supervivencia larga en GBs, siendo la media de supervivencia de 15-18 meses.
2. Otros autores han utilizado este mismo punto de corte en sus estudios [82, 83, 84], de manera que así se pueden comparar los resultados obtenidos en este estudio frente a los ya publicados.
3. La media y la mediana de la SG de la cohorte de LTS (69.8 y 60.1 meses, respectivamente) es 3 veces mayor a la media (15.1 meses) de SG del grupo de no-LTS más la desviación estándar.

Además, para la realización de un análisis comparativo de las características clínicas y moleculares de pacientes con larga y corta supervivencia se excluyeron aquellos pacientes no fallecidos con supervivencia global (SG) menor a 36 meses (6 casos). La exclusión de estos pacientes se debe a que, en dichos pacientes, la SG podría llegar a sobrepasar los 36 meses, que es el tiempo de SG establecido para el grupo de pacientes con larga supervivencia. Así mismo, se excluyeron aquellos pacientes con una supervivencia inferior a 3 meses, fallecidos debido a complicaciones postquirúrgicas u otras causas no relacionadas con la progresión tumoral (18 pacientes), y aquellos pacientes vivos sin dato de supervivencia por pérdida de seguimiento (2 pacientes). De esta manera, se incluyó un total de 157 pacientes en estos estudios comparativos entre GB con larga y corta supervivencia.

Para la realización del estudio de GBs con células gigantes (GB-CG), los pacientes se seleccionaron de forma retrospectiva mediante la inclusión de aquellos pacientes diagnosticados con GB-CG o con un diagnóstico de GB pero que en la descripción histopatológica se detallase la presencia de células gigantes multinucleadas. Según la clasificación de tumores del SNC de la OMS de 2021, el GB de células gigantes (GB-CG) es un subtipo de GB que se caracteriza histológicamente por un componente mayoritario de células gigantes multinucleadas y pleomórficas, sin estar definido un porcentaje concreto requerido para establecer el diagnóstico de este subtipo, ni una alteración molecular específica. De esta manera, en este estudio se incluyeron 36 pacientes con un diagnóstico de GB-CG o simplemente de GB, pero en los que se había descrito la presencia de células gigantes.

4.2. Muestras tisulares

Las muestras utilizadas en este estudio se recogieron en los Servicios de Anatomía Patológica del Hospital Universitario 12 de octubre (Madrid) y del Hospital Virgen de la Salud (Toledo), estando las mismas incluidas en los archivos y biobancos respectivos de cada centro, el Biobanco I+12 Instituto de investigación Hospital 12 de Octubre y el Biobanco del Hospital Virgen de la Salud BioB_HVS. Todas las muestras utilizadas en el estudio estaban fijadas en formaldehído al 4% e incluidas en parafina.

Los cortes tisulares representativos de los tumores teñidos con hematoxilina-eosina fueron revisados histopatológicamente con el fin de confirmar el diagnóstico de GB y recoger los parámetros histopatológicos.

En cada caso se seleccionaron los bloques más representativos de GB y se verificó que el contenido de células tumorales en todos los casos fuese superior al 30% para realizar los estudios moleculares y las técnicas de inmunohistoquímica. En algunos casos en los que había poca representación de células tumorales se realizó una macro disección del área de tejido con mayor densidad de células tumorales.

Por último, se seleccionaron 10 muestras de cerebro no tumorales disponibles en el biobanco del Hospital Virgen de la Salud BioB_HVS para ser utilizadas como control no tumoral (controles negativos).

4.3. Recogida de datos clínicos, anatomopatológicos y moleculares

- Variables clínicas

Para la realización de este estudio se revisaron las historias clínicas de los pacientes incluidos, recogiendo los datos correspondientes de edad en el momento del diagnóstico (en años); sexo; localización de la lesión tumoral (temporal, parietal, frontal, occipital u otra localización como cuerpo calloso, insular, intramedular o multicéntrico); sintomatología al diagnóstico (crisis epilépticas, alteración en el lenguaje, alteración de la conducta, cefalea u otros síntomas como alteraciones visuales o mareos); grado de resección quirúrgica incluyendo biopsia, resección parcial (50-85%), resección subtotal (85-95%) o resección radical (>95% tumor), estatus del paciente en el momento de recogida de datos (vivo o fallecido); fecha de último control y tipo de tratamiento recibido por estos pacientes (protocolo STUPP, quimioterapia solo, radioterapia solo u otros esquemas de tratamiento).

Se definió como SG el tiempo transcurrido entre la fecha de la intervención quirúrgica y la fecha de fallecimiento o último control del paciente. Los pacientes en los que se perdió el seguimiento se consideraron pacientes censurados en el estudio estadístico.

- Variables histológicas-moleculares

Se revisaron las características histopatológicas de las muestras recogidas a través del informe de Anatomía Patológica realizado en el momento del diagnóstico anatomopatológico. Se recogieron los datos de los de estudios realizados para el

diagnóstico incluyendo las características histopatológicas, presencia de necrosis, proliferación vascular, células gigantes multinucleadas y los resultados de las técnicas inmunohistoquímicas y moleculares realizadas.

Para el estudio de GB-CG se recogió la presencia de células gigantes multinucleadas (porcentaje), el tamaño de células gigantes y el número de núcleos presente en éstas y la presencia o ausencia de linfocitos, nucleolo, células gemistocíticas, epitelioides, regiones PNET-like (regiones que recuerdan a un tumor primitivo neuroectodérmico), necrosis y proliferación vascular. El porcentaje de células gigantes multinucleadas, su diámetro y el número de núcleos se cuantificaron manualmente analizando las células tumorales en al menos 20 campos de manera aleatoria a través del tejido con un aumento 200x.

5. METODOLOGÍA

5.1. Extracción de ácidos nucleicos y cuantificación

Una vez seleccionado el bloque tumoral representativo del tumor, se realizaron secciones de este en un microtomo, recogiéndose de 5 a 10 cortes de 5µm de espesor en tubo *ependorf* que fueron utilizados posteriormente para la extracción de ADN. La extracción de ácidos nucleicos se realizó a partir de los cortes obtenidos mediante la utilización del kit comercial *QIAamp FFPE Tissue Kit* (Qiagen, Manchester, UK), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, se eliminó previamente la parafina acompañante mediante incubación con aceite mineral a 80°C durante 5 minutos. Tras disolución de la parafina y centrifugación, se pipeteó y desechó la parafina quedando un pellet que contenía el tejido de interés. A continuación, las muestras se incubaron toda la noche a 56°C con buffer de lisis y proteinasa K con el fin de romper o degradar proteínas unidas a ADN y después se inactivó la enzima mediante incubación a 70°C durante 2 minutos.

Finalmente, se realizó la purificación de ácidos nucleicos utilizando columnas y lavados con buffers de diferente fuerza iónica. De esta manera, el ADN queda retenido en la membrana de la columna, que finalmente se eluye en un tubo *ependorf* con agua destilada.

La cantidad de ADN (ng/µl) extraído se cuantificó mediante un método fluorimétrico. Para ello se usó el fluorímetro Qubit y el kit para medir ADN de doble hebra, *Qubit™ dsDNA HS Assay* (20pg/µl – 100ng/µl) (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EE. UU), siguiendo las instrucciones del fabricante. A diferencia de los métodos basados en espectrofotometría, el método fluorimétrico permite la cuantificación de ADN de cadena simple o doble hebra de manera altamente específica.

Los métodos espectrofotométricos permiten cuantificar la cantidad de ADN total en la muestra que incluirá nucleótidos únicos, oligonucleótidos, ARN, ADN de doble hebra y ADN de hebra simple debido a la capacidad común de todos estos de absorción a una longitud de onda de 260nm. Así mismo, la presencia de contaminantes, como por ejemplo sales y otros componentes orgánicos, afectan a los valores de cuantificación obtenidos por estos métodos. Todo esto se traduce en

una sobre cuantificación del ADN sin conocimiento real de la presencia de ADN de doble hebra óptimo para las técnicas de amplificación. Por el contrario, la cuantificación mediante fluorimetría permite la cuantificación de ADN de doble hebra de manera selectiva, específica y con alta sensibilidad, mediante la utilización de sondas fluorescentes que se unen de manera específica al ADN de hebra doble. Este tipo de cuantificación mediante método fluorimétrico permite la cuantificar cantidades de ADN a bajas concentraciones, incluso por debajo de los 2ng/μl que los métodos espectrofotométricos no son capaces de detectar.

5.2. Análisis de secuenciación masiva (Next Generation Sequencing)

5.2.1 Diseño de un panel de NGS para el análisis de genes implicados en gliomas

En primer lugar, se realizó una revisión bibliográfica de los artículos publicados en el momento del inicio de este estudio acerca de las alteraciones genéticas encontradas en gliomas. En base a los resultados de Brennan et al. [53], así como estudios previos publicados acerca de las alteraciones moleculares en gliomas [52, 54, 55], se seleccionaron 30 genes que estaban frecuentemente alterados en gliomas o que eran relevantes desde un punto de vista clínico (Tabla 2).

Tabla 2. Genes seleccionados para el diseño de panel GLIO-NGS-30

Panel GLIO-NGS-30					
<i>CDKN2A</i>	<i>CDKN2B</i>	<i>PTEN</i>	<i>PIK3R1</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>PDGFRA</i>
<i>RB1</i>	<i>MSH6</i>	<i>EGFR</i>	<i>NF1</i>	<i>QKI</i>	<i>KEL</i>
<i>LZTR1</i>	<i>DAXX</i>	<i>ATRX</i>	<i>H3F3A</i>	<i>HIST1H3B</i>	<i>GLTSCR2</i>
<i>IDH1</i>	<i>IDH2</i>	<i>FOXR1</i>	<i>FUBP1</i>	<i>CIC</i>	<i>BRAF</i>
<i>KRAS</i>	<i>TP53</i>	<i>TP73</i>	<i>MET</i>	<i>TSC1</i>	<i>TSC2</i>

Para el diseño del panel de genes, en adelante “GLIO-NGS-30”, se usó el software *Ion Ampliseq Designer* (Thermo Fisher Sci.). El diseño se dirigió a todas las regiones exónicas de estos 30 genes además de 5bp a ambos extremos de los exones. Una vez realizado el diseño, se revisó que los *primers* generados cubriesen completamente las regiones exónicas mediante la visualización de los amplicones diseñados en el visor genómico IGV (*Integrative Genomic Viewer*, Broad Institute).

Así mismo, el diseño se realizó de manera que permitiese el estudio de variaciones en el número de copias (CNVs) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Por ello, las regiones génicas de interés debían estar cubiertas por al menos 10 amplicones. Para el estudio de CNVs se seleccionaron aquellos genes y/o regiones que, en base a la frecuencia y relevancia clínica, se ven amplificados o deletados en gliomas (Tabla 3).

Tabla 3. Genes y/o regiones génicas diseñadas para estudio de CNVs dentro del panel GLIO-NGS-30

Genes y/o regiones génicas para estudio de CNVs						
Amplificaciones	<i>PDGFRA</i>	<i>EGFR</i>				
Deleciones	1p	19q	<i>CDKN2A</i>	<i>RB1</i>	<i>PTEN</i>	<i>NF1</i>

Debido al tamaño y al contenido del panel a diseñar, los *primers* para la amplificación de los amplicones se multiplexaron en 2 *pools* con el fin de evitar amplificaciones inespecíficas.

5.2.2 Preparación de librerías

La generación de librerías se realizó mediante amplificación del panel GLIO-NGS-30 usando el kit *AmpliSeq Library Kit v2.0* (Thermo Fisher Sci.), siguiendo las instrucciones del fabricante (Figura 14).

El ADN de cada una de las muestras se amplificó mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*)-Multiplex con cada uno de los 2 *pools* de *primers* que contiene el panel GLIO-NGS-30 a partir de 10ng totales de DNA genómico.

Tras la amplificación, para cada muestra se juntaron las dos reacciones de amplificación de los 2 *pools* de *primers* y se llevó a cabo una reacción de digestión enzimática de los *primers* empleados para la amplificación. Esta digestión enzimática se realizó mediante utilización del reactivo FUPA, que contiene una o más enzimas que degradan uracilo, formamidopiridina-ADN glicosilasa y una ADN polimerasa como *Pol1*. Este paso de digestión degrada parcialmente los *primers* unidos al ADN amplificado y prepara los fragmentos de ADN para la posterior unión de los adaptadores de amplificación (P1) y *barcodes* (X).

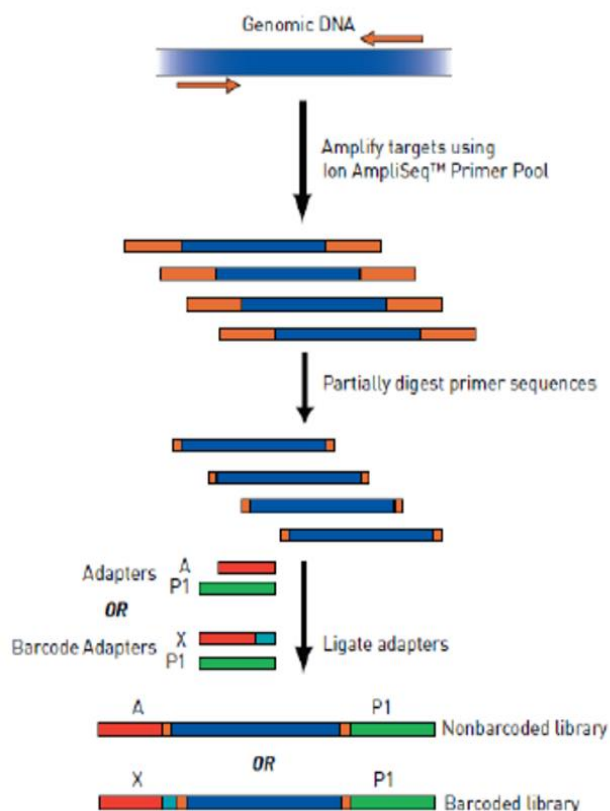


Figura 14. Flujo de trabajo para la preparación de librerías. Imagen obtenida del protocolo de preparación de librerías de Thermo Fisher Sci.

Tras la digestión enzimática parcial de los *primers*, se realizó una reacción de ligación de adaptadores (P1), necesarios para la PCR de emulsión y *barcodes* (X) en los extremos de los fragmentos de ADN de cada muestra mediante incubación con una enzima ligasa a 22°C durante 30 minutos, 68°C 5 minutos y 72°C 5 minutos. El *barcode* (código de barras) es una secuencia corta de ácidos nucleicos (oligonucleótido) que es reconocida en la secuenciación, identificada y asignada a un número concreto que permitirá identificar inequívocamente cada muestra. Para este proceso de generación de librerías se utilizaron termocicladores de placas *Veriti™ 96-Well Thermal Cycler* (Thermo Fisher Sci.).

Las librerías realizadas de cada muestra se sometieron a una purificación magnética empleando el reactivo *Agencourt Ampure* (Beckman Coulter, California, EEUU) para la eliminación de sales, dNTPS, enzimas, oligonucleótidos, dímeros u otras moléculas sobrantes, con el fin de obtener únicamente los fragmentos amplificados. *Agencourt Ampure* es un reactivo compuesto por unas esferas magnéticas que se encuentran cargadas positivamente, por lo que muestran afinidad por las cargas negativas de los ácidos nucleicos. De esta manera, cuanto más larga sea la cadena de ácidos nucleicos, más cargas negativas presenta y mayor afinidad por las esferas magnéticas. Utilizando la proporción correcta de esferas magnéticas en base al tamaño del fragmento de ADN que se quiere purificar, las moléculas de ADN con el tamaño de interés quedan adheridas a las esferas y las que no cumplen con ese tamaño, junto con el resto de las moléculas presentes, quedan en el eluyente. Tras diferentes lavados con etanol, finalmente los fragmentos de ADN de interés se resuspenden en agua o buffer de elución (*Low TE* proporcionado en el kit) (Figura 15).

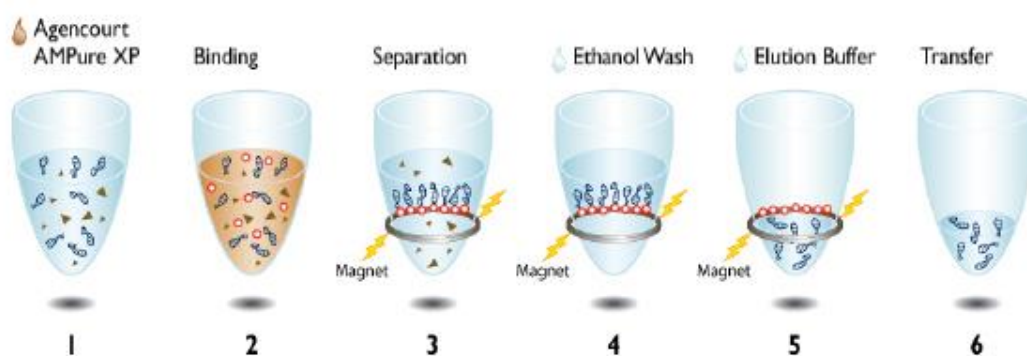


Figura 15. Purificación magnética de ADN. Imagen obtenida de las instrucciones de uso de *Agencourt AMPure*.

Tras la purificación, las librerías se cuantificaron mediante PCR cuantitativa (q-PCR) en un equipo 7500 Applied Biosystems™ usando el kit *Ion Library TaqMan Quantification Kit* (ambos de Thermo Fisher Sci.), siguiendo el procedimiento estándar que incluye una recta patrón con un ADN de *Escherichia Coli* DH10B para poder extrapolar la concentración de ADN de interés a partir de la fluorescencia emitida. Se realizaron triplicados de todas las muestras, así como de los controles, con el fin de poder realizar una media entre los valores obtenidos.

5.2.3 Amplificación y secuenciación de librerías

Definido el parámetro, cobertura (profundidad), como el número promedio de veces que una determinada posición se “leerá” en el secuenciador, se estimó que una profundidad media aproximada de 800 lecturas (800x) sería necesaria para realizar el estudio. De esta manera, se calculó que con esta cobertura media se podrían detectar mutaciones somáticas presentes en la muestra tumoral con una frecuencia mínima aproximada del 5%.

En función de la cobertura deseada y el número de amplicones del panel se calculó el número de lecturas totales por muestra necesario:

$$n^{\circ} \text{ lecturas por muestra} = n^{\circ} \text{ amplicones panel} * \text{cobertura objetivo}$$

De esta manera, en función de la capacidad del chip (lecturas totales) utilizado en el secuenciador, calculamos el número de muestras a multiplexar en cada run.

$$n^{\circ} \text{ muestras} = \frac{n^{\circ} \text{ lecturas totales}}{n^{\circ} \text{ lecturas por muestra}}$$

Calculada la concentración de cada librería, se mezclaron aquellas muestras a multiplexar en cada experimento de secuenciación de forma que todas tuvieran una concentración equimolar. Las librerías así multiplexadas se amplificaron mediante PCR de emulsión utilizando el sistema *OneTouch™ 2* y/o el sistema automatizado *Ion Chef System* (Thermo Fisher Sci.).

La amplificación mediante PCR de emulsión se basa en la amplificación clonal de cada fragmento de ADN sobre la superficie de una partícula, denominada *Ion Sphere Particle* (ISP). Estas partículas presentan unos fragmentos complementarios a los adaptadores incorporados a las librerías de manera que el ADN quede unido a la ISP. Mediante la emulsión de aceite en un medio acuoso, se generan millones de gotas de aceite, “micro-reactores”, en los que queda embebida una ISP unida a ADN produciéndose la amplificación clonal del fragmento sobre la superficie de la ISP (Figura 16). De esta manera se generan las condiciones necesarias para que, en una situación ideal, en cada micro-reactor se produzca la amplificación clonal de una única molécula de ADN que será secuenciada.

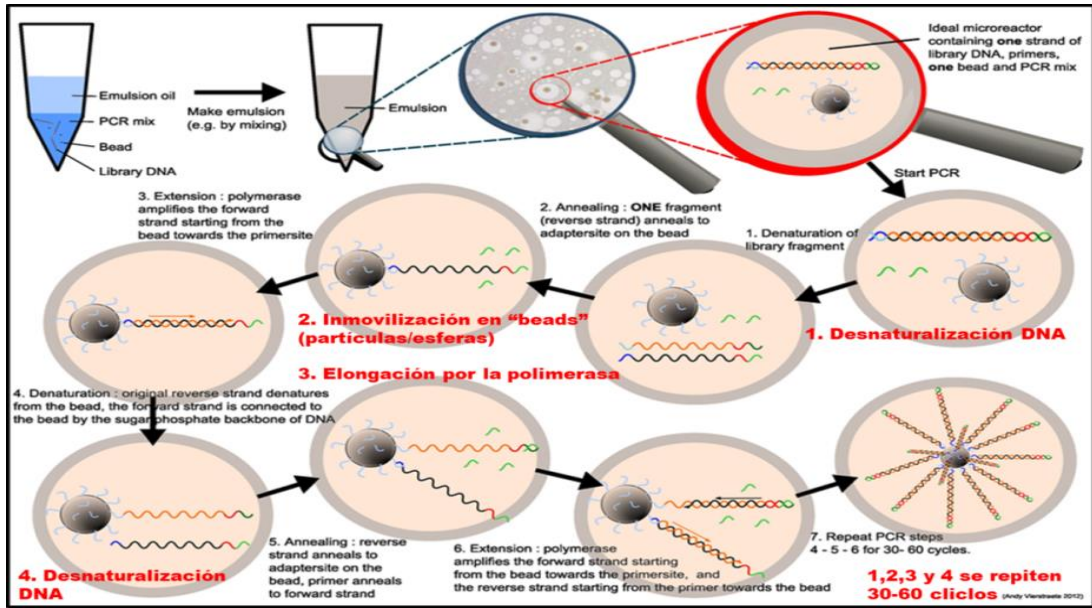


Figura 16. PCR de emulsión tecnología Ion Torrent. Figura adaptada de Andy Vierstraete Department of Biology, Ghent University. Center for Molecular Phylogeny and Evolution.

Para la secuenciación se utilizaron los sistemas *Ion PGM* o *Ion GeneStudio S5*, ambos basados en la tecnología semiconductora *Ion Torrent*, y las librerías, multiplexadas y amplificadas se cargaron en los chips de secuenciación de manera manual o automatizada con el sistema *Ion Chef* (Thermo Fisher Sci.). La cantidad de librería cargada en los chips de secuenciación fue de 8pM (en el caso de la carga del chip mediante el sistema *Ion Chef* se prepara una solución a 40pM). De esta forma, cada ISP se deposita en el interior de uno de los millones de pocillos que presentan estos chips.

Durante el proceso de secuenciación, el secuenciador libera nucleótidos de forma secuencial y cíclica sobre el chip. La tecnología *Ion Torrent* detecta los cambios de pH ocurridos en cada pocillo como consecuencia de la liberación de iones hidrógeno en cada uno de ellos tras la unión del nucleótido complementario, reconociendo así si un nucleótido ha sido añadido o no al fragmento de ADN (Figura 17).

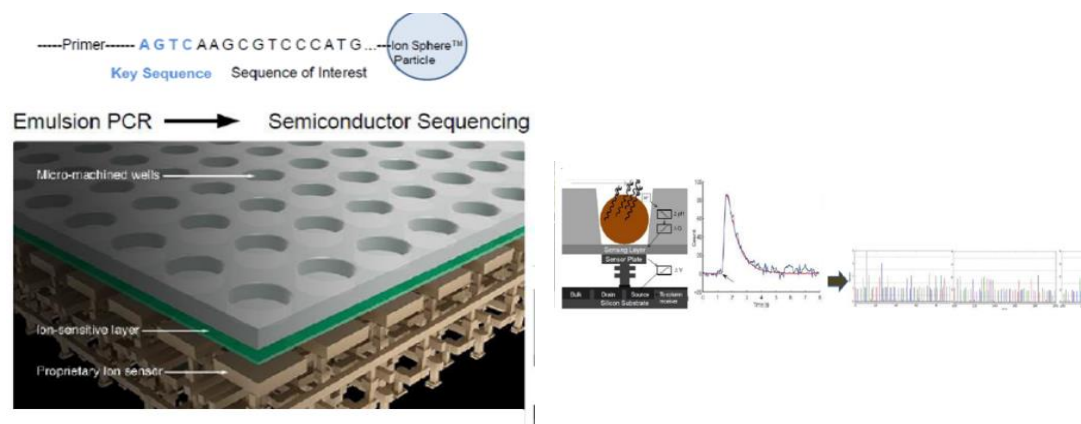


Figura 17. Sistema de secuenciación por semiconductores con la tecnología Ion Torrent de detección de H⁺. Imagen obtenida de la documentación comercial de ThermoFisher Scientific.

5.2.4 Análisis bioinformático

Se realizó el análisis primario y secundario de los resultados a través de la herramienta informática incorporada en los sistemas de secuenciación empleados, Torrent Suite v.4.2 (Thermo Fisher Sci.). En primer lugar, se procesó el archivo FASTQ obtenido tras la secuenciación, en el que se eliminaron los nucleótidos de baja calidad en los extremos. En segundo lugar, se mapearon las secuencias obtenidas utilizando el genoma humano de referencia (hg19) y utilizando el programa *Torrent Mapping Alignment* (TMPA). De esta manera, se obtuvo finalmente el archivo de resultados en formato BAM en el que se encuentran almacenadas las secuencias alineadas y ordenadas (Figura 18).

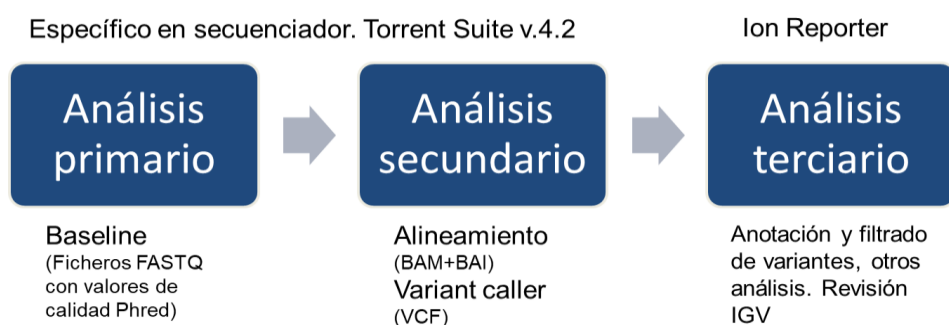


Figura 18. Flujo de trabajo para el análisis de resultados de secuenciación masiva.

La calidad de las secuencias obtenidas se determinó mediante el análisis del número de lecturas total por muestra, cobertura media conseguida, tamaño medio de los fragmentos secuenciados y porcentaje de lecturas en los genes diana (*On target*).

- **Análisis de mutaciones puntuales (SNVs) y pequeñas inserciones/deleciones (INDELS).**

El anotado y filtrado de variantes (análisis terciario) se realizó usando el software de análisis *Ion Reporter* (Thermo Fisher Sci). Una vez obtenidas y anotadas, se descartaron las siguientes variantes:

1. Aquellas con menos de 30 lecturas.
2. Con una frecuencia alélica menor del 10%.
3. Localizadas fuera de regiones exónicas o de *splicing*.
4. Sinónimas.
5. Presentes en la población con una frecuencia alélica mayor del 1% de acuerdo con diferentes bases de datos poblacionales (*ExAc Exome Agregation Consortium* <https://gnomad.broadinstitute.org/>; *dbSNP* *NCBI* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) en base al proyecto 1000Genomes (*dbSNP 138*).

Finalmente, las variantes obtenidas fueron visualizadas una a una en el visor genómico IGV (Broad Institute, <http://www.broadinstitute.org/igv/>) con el fin de descartar aquellas variantes consecuencia de errores sistemáticos de secuenciación o artefactos debidos a la fijación del tejido [76].

- **Análisis de variaciones en el número de copias (CNVs).**

Para el análisis de CNVs se utilizó el software *Ion Reporter*. El algoritmo empleado por el software para este análisis se basa en la normalización de las coberturas obtenidas de los amplicones para predecir el número de copias o el estado de ploidía. De esta manera, la cobertura obtenida es comparada con la cobertura media obtenida de un conjunto de muestras de referencia utilizadas como control que se secuenciaron previamente y que son utilizadas como línea base (*baseline*).

Para la realización del *baseline* de comparación para el estudio de CNVs se siguieron las instrucciones del fabricante. El conjunto de muestras control de referencia está formado por el ADN obtenido de 10 muestras de tejido no tumoral de varones y con una dotación genética 2n. Se han de seleccionar muestras de ADN de varones para tener así comparativa de regiones génicas en el cromosoma Y (que indican una copia del cromosoma X).

Para el análisis de los resultados obtenidos de las muestras tumorales se excluyeron aquellos CNVs con un valor de confianza menor a 20 y un valor de precisión menor de 10 siguiendo las instrucciones del fabricante. El análisis de CNVs proporcionado por el software *Ion Reporter* proporciona el número de copias en una región determinada. Se establecieron valores de amplificación de un gen cuando según el algoritmo empleado el número de copias con respecto al conjunto de muestras control de referencia se encontraba entre x8 y x10 (x10 es el valor máximo que se obtiene, no pudiendo cuantificar más de 10 copias del gen, aunque el número presente en la muestra sea mucho mayor). Por otro lado, para la determinación de deleciones, el software estimó la presencia de una deleción homocigota cuando el número de copias con respecto a la referencia es de x0 y deleción hemicigota cuando el número de copias es x1. En cuanto a los valores de número de copias que se encuentren entre x2 (normal) y x8 (amplificado), queda al criterio del usuario dado que las muestras de ADN utilizadas en este estudio provienen de tejidos incluidos en parafina y son de baja calidad para la detección de ganancias de bajo nivel. Para este estudio no se obtuvieron en cuenta los valores comprendidos entre x2 y x8.

5.2.5 Validación de resultados obtenidos por NGS mediante base de datos públicos

Se consultaron las diferentes bases de datos públicas en muestras de GB y de cáncer para comparar los resultados obtenidos de secuenciación masiva. Para el análisis de las variantes identificadas se consultaron las siguientes bases de datos:

- COSMIC (*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*) <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>: Esta base de datos se utilizó para comprobar la

presencia de las variantes genéticas encontradas en los diferentes tumores secuenciados cuyo dato se encuentra registrado en la misma.

- *TP53 database* (<https://p53.iarc.fr/>).

- ExAc (*Exome Aggregation Consortium*) (<http://exac.broadinstitute.org>).

Para la validación de resultados en series externas, se consultó la base de datos del TCGA (*The Cancer Genome Atlas*), que se consultó a través del recurso web CBIOPORTAL (<https://www.cbioportal.org/>). Se seleccionaron aquellas muestras con diagnóstico de GB incorporadas en esta base de datos con disponibilidad de resultados moleculares (mutaciones y CNVs) y datos clínicos, y se compararon los perfiles moleculares y datos clínicos de dichas muestras con los resultados obtenidos en este estudio.

5.2.6 Análisis de carga mutacional tumoral mediante NGS

El análisis de la carga mutacional tumoral (*Tumor Mutation Load, TML*) se realizó mediante secuenciación masiva con el panel *Oncomine Tumor Mutation Load Assay* (Thermo Fisher Sci.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las librerías se realizaron a partir de 20ng de ADN extraído de muestras incluidas en parafina y se secuenciaron siguiendo los procedimientos descritos anteriormente. El panel *Oncomine TML Assay* permite analizar 409 genes implicados en cáncer (incluyendo 1.2Mb de regiones exónicas) con una cobertura total de 1.7Mb. El análisis bioinformático de los resultados obtenidos se realizó mediante la utilización de los softwares *Torrent Suite v.4.2* e *Ion Reporter* tal y como se ha descrito en el punto 3.2.4.

El valor de TML, se obtuvo dividiendo el número de variantes obtenidas tras el análisis realizado por el número de bases totales leídas en la secuenciación de la muestra.

5.3. Piro-secuenciación

Las mutaciones detectadas en el estudio de NGS se validaron mediante Piro-secuenciación en las regiones *hotspot* de los genes *IDH1* (R132), *IDH2* (R172), *H3F3A* (K27 y G34) y *HIST1H3B* (K27). Además, mediante este método, se estudiaron también las mutaciones en el promotor del gen *TERT* (C228, C250 y C242-243) en las muestras incluidas en este estudio.

Para la realización de esta técnica, la región del ADN de interés es amplificada mediante el empleo de dos *primers* dirigidos a dicha región de interés para su amplificación, uno de ellos marcado con Biotina, y un *primer* de secuenciación. El marcado con biotina de uno de los *primers* utilizados para la amplificación permite que una de las hebras del ADN quede biotinilada, pudiendo así aislarla *a posteriori* mediante unión con estraptavidina.

En el proceso de piro-secuenciación, el *primer* de secuenciación se une a la hebra de ADN biotinilada y tras incubación con DNA polimerasa, ATP sulfurilasa,

5.3.2 Amplificación mediante PCR y piro-secuenciación

Las regiones de interés de los genes mencionados anteriormente se amplificaron mediante PCR utilizando el *kit PyroMark PCR* (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante, en un termociclador *Veriti™ 96-Well Thermal Cycler* (Thermo Fisher Sci.). Se utilizaron *primers forward* y *reverse* (Tabla 4) a una concentración final de 12pmol/μl, la mezcla *Pyromark PCR mastermix 2x*, que contiene la cantidad necesaria de enzima, dNTPs y MgCl₂, y el reactivo coral load 10x, ambos a la concentración final 1x en un volumen final de 25μl. En el caso de la amplificación del promotor del gen *TERT*, se añadió a la mezcla de reacción 5μl del reactivo *Q-solution*, el cual está indicado para mejorar la amplificación de regiones ricas en CG. La amplificación se realizó siguiendo las condiciones descritas en la (Tabla 5). La calidad de los productos amplificados se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Tabla 5. Condiciones amplificación productos pirosecuenciación

Desnaturalización	95°C	15 minutos
Amplificación	x 45 ciclos	
Desnaturalización	95°C	30 segundos
Hibridación	60°C	30 segundos
Elongación	72°C	30 segundos
Extensión final	72°C	10 minutos

Tras la amplificación se realizó la desnaturalización del producto amplificado, aislamiento de la hebra molde e hibridación con el *primer* de secuenciación (Tabla 4) con la estación de vacío *PyroMark Q24* (Qiagen), siguiendo las instrucciones de fabricante, y finalmente se secuenció en secuenciador *PyroMark Q24* (Qiagen). Los resultados obtenidos se analizaron empleando el software *Pyrogram ID v.2.5* (Qiagen).

5.4. Secuenciación Sanger

Los resultados obtenidos mediante secuenciación masiva se confirmaron mediante secuenciación Sanger de algunas de las variantes de interés. Los *primers* específicos se diseñaron mediante la aplicación *Primer-Blast* (*National Library of Medicine* del *National Institute of Health*, EEUU, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Se comprobó que las temperaturas de anillamiento de los *primers* fuesen similares y que no existiese la posibilidad de amplificaciones inespecíficas en otras regiones.

Para la amplificación se utilizó el reactivo, *GoTaq Master Mix* (Promega, Wisconsin, EEUU) que contiene la enzima DNA polimerasa, nucleótidos (dNTPs), MgCl₂ y buffer de reacción a las concentraciones óptimas. El ADN se desnaturalizó durante 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de desnaturalización, anillamiento y amplificación de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C y 30 segundos a 72°C, respectivamente. Finalmente se realizó una extensión final de 10 minutos a 72°C. Los

productos amplificados se purificaron mediante columnas s utilizando el kit *QIAquick PCR purification kit* (Qiagen).

La reacción de secuenciación se realizó sobre el producto amplificado utilizando los *primers forward* y *reverse* por separado de modo que se obtuvieron las secuencias de cada una de las hebras por separado. Para la reacción de secuenciación se realizó una reacción de síntesis de la hebra complementaria utilizando una mezcla de nucleótidos y dideoxinucleótidos marcados con fluorescencia y buffer de reacción contenidos en el kit *BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* (Thermo Fisher Sci.). Finalmente, se purificó el producto de la reacción de síntesis mediante utilización del kit de purificación *BigDye XTerminator* (Thermo Fisher Sci.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los fragmentos obtenidos de la reacción de síntesis se separaron mediante electroforesis capilar y se detectaron los nucleótidos presentes mediante emisión de fluorescencia de estos en secuenciador *ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer System* (Thermo Fisher Sci.). La secuencia obtenida se analizó utilizando el software Chromas (Technelysium Pty Ltd.) comparando la secuencia obtenida de la muestra tumoral con la de referencia depositada en las bases de datos del genoma humano (hg19).

5.5. Análisis de metilación promotor del gen MGMT

El estado de metilación del promotor del gen *MGMT* se estudió mediante PCR específica de metilación (*Methylation specific PCR*, MS-PCR) a partir del ADN previamente tratado con bisulfito. Este tratamiento convierte las citosinas no metiladas (no unidas a grupo CH₃ metilo) en uracilos, mientras que aquellas citosinas que presentan un grupo metilo unido en su posición 5', es decir las citosinas metiladas, no sufren esta conversión. Tras el tratamiento con bisulfito del ADN, se realiza la amplificación de la región del promotor de *MGMT* empleando *primers* específicos de las secuencias de ADN metiladas (M) o no metiladas (UM) para cada muestra. La presencia de ADN metilado o no metilado se valora mediante electroforesis en gel de agarosa del producto obtenido en cada PCR (M y UM), por lo que la presencia de ADN amplificado en el producto de PCR con los *primers* específicos para la secuencia metilada indica positividad para la metilación del promotor.

5.5.1 Tratamiento con bisulfito

El ADN extraído de las muestras se trató con bisulfito sódico. Para este tratamiento se utilizó el kit *EpiTect Bisulfite* (Qiagen). La reacción de conversión se consigue mediante incubación de 500ng-1µg de ADN a altas temperaturas con bisulfito, siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras la conversión, se realizó una purificación del ADN modificado con columnas con el fin de eliminar restos de bisulfito, sales y otros agentes químicos. Como control de la técnica de conversión mediante bisulfito, en cada ensayo siempre se realiza el tratamiento de un ADN control positivo (DNA metilado *in vitro*) y un ADN control negativo (ADN no tumoral) para ser utilizados como control de la técnica.

5.5.2 PCR específica metilación (MS-PCR)

El ADN tratado con bisulfito de cada una de las muestras se amplificó por duplicado utilizando *primers* específicos para la amplificación del promotor del gen *MGMT* metilado o no metilado (Tabla 6).

Tabla 6. Secuencia de los *primers* utilizados para detectar la secuencia metilada y no metilada del promotor del gen *MGMT*

Primers específicos de:	Primers <i>MGMT</i>	
ADN (M)	<i>Forward</i>	5'- TTTCGACGTTTCGTAGGTTTTTCGC-3'
	<i>Reverse</i>	5'- GCACTCTTCCGAAAACGAAACG-3'
ADN (UM)	<i>Forward</i>	5'- TTTGTGTTTTGATGTTTGTAGGTTTTTGT-3'
	<i>Reverse</i>	5'- AACTCCACACTCTTCCAAAAACAAAACA-3'

Junto con las muestras objeto de estudio se amplificaron los controles mencionados del tratamiento, así como un ADN no tratado con bisulfito, este último se utilizó como control de especificidad de la PCR.

Para la amplificación se utilizaron 5µl de ADN tratado junto con dNTPs (0.2mM), los *primers* detallados (15pmol), Cl₂Mg (15mM), enzima Amplitaq Gold (1U) y buffer (1x) en un volumen final de 15µl siguiendo las condiciones de PCR descritas en la (Tabla 7). Finalmente se visualizaron los productos obtenidos en cada reacción de amplificación en gel de agarosa al 3%.

Tabla 7. Condiciones de amplificación mediante PCR para la detección de secuencia metilada y no metilada del promotor gen *MGMT*

Desnaturalización	95°C	15 minutos
2 ciclos		
Desnaturalización	95°C	30 segundos
Hibridación	62°C	30 segundos
Elongación	72°C	30 segundos
2 ciclos		
Desnaturalización	95°C	30 segundos
Hibridación	60°C	30 segundos
Elongación	72°C	30 segundos
36 ciclos		
Desnaturalización	95°C	30 segundos
Hibridación	58°C	30 segundos
Elongación	72°C	30 segundos
Extensión final	72°C	7 minutos

5.6. Estudio de Hibridación In Situ Fluorescente (FISH)

La validación de los resultados de CNVs obtenidos mediante el estudio de NGS con respecto a las alteraciones en el gen *EGFR* y *CDKN2A* se realizó mediante un análisis de hibridación *in situ* fluorescente (FISH).

Para llevar a cabo esta técnica, se obtuvieron cortes de 4 µm de espesor de bloques tisulares de parafina que se colocaron sobre portaobjetos de vidrio tratados. Los cortes se incubaron en estufa a 65°C, mínimo 1 hora y se desparafinaron mediante 2 incubaciones en Xilol de 5 minutos. Tras la eliminación de la parafina, se re-hidrataron los cortes mediante incubaciones dobles de 2 minutos en etanol a concentraciones decrecientes (100%, 70%) y finalmente en agua destilada.

Para permitir la accesibilidad de la sonda a su diana, es necesario realizar un pretratamiento de las muestras con calor (98-100°C) en solución de citrato sódico pH6 durante 30 minutos (“desenmascaramiento”). Con este tratamiento se consiguen eliminar las uniones de formol con el ADN producidas durante la fijación de la muestra, así como la unión de proteínas al ADN diana. Posteriormente, se eliminaron las proteínas y restos citoplasmáticos mediante digestión con proteinasa K a 37°C durante 20 minutos. Tras la digestión, los cortes se deshidrataron mediante incubaciones de 2 minutos en agua destilada (3 incubaciones) y posteriormente con etanol a concentraciones crecientes (70%, 85% y 100%).

La sonda problema se aplicó sobre el tejido tumoral, realizándose una desnaturalización del ADN y sonda a 75°C durante 5 minutos previa a su hibridación a 37°C durante toda la noche en condiciones de humedad. Este proceso se realizó con en hibridador *Thermobrite* (Leica, Wetzlar, Alemania). Finalmente, los cristales se lavaron con buffer 0.4x de solución de citrato sódico (SSC) durante 2 minutos a 72°C y después se lavaron con buffer 2xSSC y 0.05% Tween20 durante 30 segundos a temperatura ambiente con el fin de eliminar sonda unida inespecíficamente que pueda producir señales de fondo y enmascarar las señales de hibridación específicas. Por último, se realizó una contra tinción nuclear de las células con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) y se visualizaron en microscopio de fluorescencia.

5.6.1 FISH de *EGFR* y *CDKN2A*

Para la detección de amplificaciones en el gen *EGFR* localizado en el cromosoma 7, se utilizó la sonda *EGFR/CEP7* (Metasystems, Altlußheim, Alemania). El número de copias del gen *EGFR* se evaluó mediante la utilización de una sonda marcada con el fluoróforo Texas Red dirigida a marcar el gen *EGFR* y una sonda marcada con el fluoróforo FITC dirigida a marcar la región centromérica del cromosoma 7 (Figura 20A). Así pues, en una célula normal hibridada con la sonda *EGFR/CEP7*, se observarán dos señales rojas correspondientes a las dos copias del gen *EGFR* y dos señales verdes que marcan los dos centrómeros del cromosoma 7. Una célula con amplificación del gen *EGFR* mostrará numerosas señales rojas y dos señales verdes.

Se consideró que una muestra presentaba amplificación de *EGFR* cuando al menos un 10% de los núcleos observados mostraban señales incontables (*cluster*) correspondiente a la señal del gen *EGFR* y dos señales verdes centroméricas.

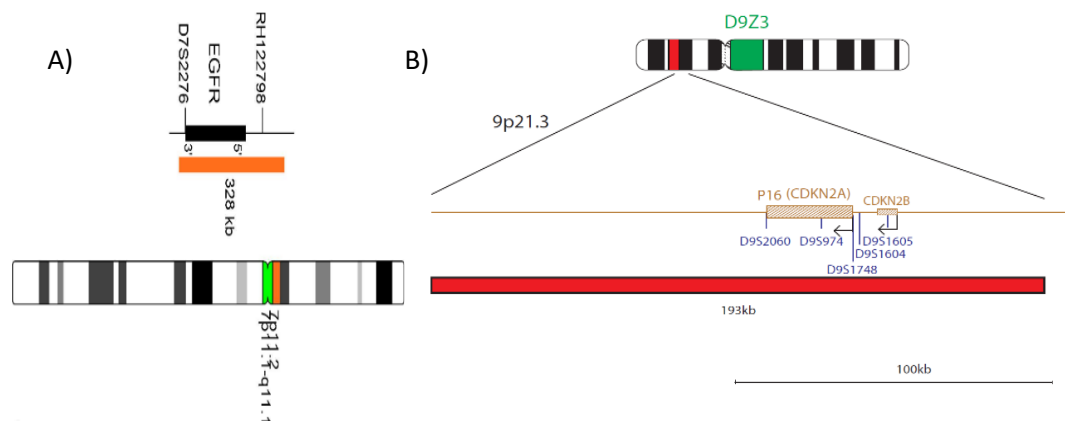


Figura 20. Diseño de la sonda para estudio de (A) amplificaciones del gen *EGFR* y (B) deleciones de *CDKN2A*. Imágenes obtenidas de las instrucciones de uso de cada una de las sondas empleadas.

Para la detección de deleciones del gen *CDKN2A* localizado en el cromosoma 9, se utilizó la sonda *CDKN2A/D9Z3* ((Cytocell, Cambridge, UK). Mediante la utilización de una sonda marcada con el fluoróforo Texas Red dirigida a marcar el gen *CDKN2A* y una sonda marcada con el fluorofoto FITC dirigida a marcar la región centromérica del cromosoma 9 (*D9Z3*), se evaluó la presencia de deleciones en homocigosis o hemicigosis del gen (Figura 20B).

Con el fin de poner a punto el análisis de la deleción del gen *CDKN2A* mediante FISH, se utilizaron un total de 3 muestras tisulares control de cerebro (no tumorales) previo al análisis de muestras tumorales. Para el análisis de este gen, se llevó a cabo la cuantificación de las señales de 10 núcleos en 10 campos distintos. En base a los controles no tumorales, se estableció que una muestra presentaba deleción homocigota de *CDKN2A* cuando al menos un 30% de los núcleos observados tenían 2 señales centroméricas y ninguna del gen.

5.7. Estudio Inmunohistoquímico

Para evaluar la expresión de la forma mutada de *IDH1 R132H*, la forma mutada de *H3F3A K27M* y la expresión de las proteínas *TP53* y *ATRX* se realizaron técnicas inmunohistoquímicas utilizando un procesador de tinción automatizado *Leica Bond* (Leica Biosystems).

Se cortaron secciones de tejido de los bloques de parafina a 5µm y se secaron a 70°C durante 30 min. A continuación, la desparafinación y la recuperación antigénica se realizó en el sistema *Bond III* con solución de recuperación 1 (pH6) y 2

(pH9). Las secciones se incubaron con los anticuerpos primarios descritos en la Tabla 8, usando el protocolo estándar *Leica Bond IHC-F*. El kit de detección *Leica Bond Polymer Refine DAB* se utilizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se consideró positividad para el anticuerpo anti-IDH1 R132H y anti H3F3A K27M, y por tanto mutado, cuando se detectó tinción citoplasmática y nuclear respectivamente en células tumorales y negativo en ausencia de dicha tinción.

ATRX se clasificó como positivo o negativo según los resultados de presencia o ausencia de expresión nuclear inmunohistoquímica. Se consideró tinción negativa sólo en aquellos casos en los que una pérdida de tinción nuclear se limitó a las células tumorales y si existía un control positivo interno apropiado en las células no tumorales adyacentes (células endoteliales, neuronas corticales o células inflamatorias).

Se determinó como positivo la presencia de la proteína mutada TP53 cuando se observó tinción nuclear positiva intensa anti-TP53 en más de un 10% de células tumorales.

Tabla 8. Anticuerpos empleados, diluciones y condiciones de tinción

Anticuerpo	Clon	Desenmascaramiento antigénico	Dilución	Casa Comercial
IDH1 R132H	DIA-H09-Anti-IDH1	10 min pH9	1/200	Dianova
ATRX	HPA001906 Anti-ATRX Policlonal	30 min pH9	1/50	Sigma
TP53	NCL-Lp53-DO7	20 min pH6	1/25	Leica
H3F3A K27M	Histona H3K27- policlonal	20min pH9	1/5000	Millipore

5.8. Análisis estadístico

Los datos registrados se recopilaron en una base de datos en Microsoft Excel 2000 (Microsoft Corporation, EEUU). Para los análisis estadísticos se utilizaron los programas informáticos Statistical package for Social Science (SPSS 11.0.0. LEAD Technologies, Chicago, IL, EEUU) y GraphPad Statistics (<http://www.graphpad.com>).

Se realizó el análisis descriptivo de frecuencias de las variables recogidas. Las variables moleculares se evaluaron de manera descriptiva y se determinó la significación estadística de las diferencias observadas entre grupos mediante la prueba estadístico t-test o la prueba exacta de Fisher. Se consideró el valor p-valor <0.05 como umbral de significación estadística.

La supervivencia global (SG) se evaluó mediante el análisis de curvas de supervivencia Kaplan-Meier para estimar la distribución de supervivencia en función de la alteración molecular detectada. Para evaluar las diferencias entre las curvas de supervivencia se utilizó la prueba Log-rank, determinando una diferencia estadísticamente significativa entre las curvas cuando el p-valor fuese menor de 0.05.

RESULTADOS

RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1. DISEÑO Y VALIDACIÓN DE UN PANEL DIRIGIDO DE GENES PARA EL ESTUDIO MOLECULAR DE LOS GLIOMAS MEDIANTE NGS

6.1.1 Diseño del panel dirigido de genes GLIO-NGS-30

Con el fin de llevar a cabo estudios de secuenciación masiva en gliomas se diseñó un panel de genes (en adelante denominado GLIO-NGS-30) que permite analizar toda la región codificante de 30 genes seleccionados (además de 5 bp a ambos extremos de los exones) con un total de 1.139 amplicones divididos en dos *pools* de *primers*. El tamaño medio de los amplicones diseñados fue de 125-150 bp. El diseño final obtenido permite la secuenciación de un total de 120.54 kb por muestra y cubre el 94.55% de todas las regiones de interés inicialmente incluidas (Tabla 1).

Tabla 9. Resumen del diseño del panel de genes GLIO-NGS-30

Gen	Nº de amplicones	RefSeq	Región cubierta*	Cobertura total (%)
ATRX	107	NM_000489	CDS, exones 1-35	95,9
BRAF	37	NM_004333	CDS, exones 1-18	94,6
CDKN2A	8	NM_000077	CDS, exones 1-3	50,9
CDKN2B	4	NM_004936	CDS, exones 1-2	64,7
CIC	56	NM_015125	CDS, exones 1-20	90,4
DAXX	30	NM_001141970	CDS, exones 1-8	90,1
EGFR	60	NM_005228	CDS, exones 1-28	99,9
FOXR2	10	NM_198451	CDS, exones 1	100,0
FUBP1	36	NM_003902	CDS, exones 1-20	98,8
H3F3A	4	NM_002107	CDS, exones 2-3	63,7
HIST1H3B	5	NM_003537	CDS, exones 1	95,2
IDH1	21	NM_005896	CDS, exones 3-10	97,7
IDH2	20	NM_002168.2	CDS, exones 2-11	90,8
KEL	35	NM_000420	CDS, exones 1-19	99,3
KRAS	10	NM_033360	CDS, exones 2-6	90,3
LZTR1	38	NM_006767	CDS, exones 1-21	96,2
MET	57	NM_001127500	CDS, exones 2-21	98,9
MSH6	45	NM_000179	CDS, exones 1-10	94,8
NF1	131	NM_001042492	CDS, exones 1-58	98,5
NOP53	18	NM_015710	CDS, exones 1-13	72,0
PDGFRA	48	NM_006206	CDS, exones 2-23	100,0
PIK3CA	47	NM_006218	CDS, exones 2-21	96,9
PIK3R1	39	NM_181523	CDS, exones 2-16	98,4
PTEN	18	NM_000314	CDS, exones 1-9	95,7
QKI	17	NM_006775	CDS, exones 1-8	98,6
RB1	51	NM_000321	CDS, exones 1-27	93,1
TP53	22	NM_000546	CDS, exones 2-11	100,0
TP73	28	NM_005427	CDS, exones 2-14	86,0
TSC1	47	NM_000368	CDS, exones 3-23	94,8
TSC2	90	NM_000548	CDS, exones 2-42	96,8

*CDS (coding sequence): Región codificante

Este diseño permitiría la detección de variantes (mutaciones puntuales e INDELS) en los genes indicados en la Tabla 9, así como alteraciones en el número de copias (CNVs) en los genes *PDGFRA*, *EGFR*, *CDKN2A* y las regiones cromosómicas 1p y 19q. De esta manera, quedaron cubiertos los genes *driver* más frecuentemente alterados en gliomas (*IDH*, *H3F3A*, *BRAF*, *ATRX*, *NF1*), y las vías de señalización alteradas con mayor frecuencia en GB: la vía de señalización de los receptores tirosina quinasa (RTK, incluyendo los genes *EGFR*, *PDGFRA*, *MET*), la vía de señalización de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K, incluyendo los genes *PIK3CA*, *PIK3R1*, *PTEN*) y la vía de señalización del ciclo celular (*TP53* y *RB1*) (53) (Figura 11).

6.1.2 Validación del panel GLIO-NGS-30

Para la validación del diseño del panel GLIO-NGS-30 se realizaron dos análisis: *i*) el análisis de muestras no tumorales y de muestras con mutaciones ya conocidas identificadas por otros métodos para determinar la especificidad de los resultados y, *ii*) el análisis de una serie de muestras ya estudiadas mediante secuenciación masiva con otro panel comercial con mayor contenido en genes.

En primer lugar, se seleccionaron y secuenciaron 10 muestras no tumorales y se analizaron las variantes detectadas. Tras los análisis y filtrados especificados previamente en la sección 3.2.4 de *Material y Métodos*, en este estudio no se detectaron variantes patogénicas en las muestras analizadas. Sólo 2 muestras mostraron variantes *missense* de significado incierto pero descritas en las bases de datos poblacionales a baja frecuencia (Tabla 10). Dada la frecuencia alélica de estas variantes, el hecho de que estén descritas en las bases de datos de genomas no tumorales, y que las muestras analizadas son tejidos no tumorales, dichas variantes se consideraron polimorfismos de baja frecuencia.

Tabla 10. Variantes identificadas en muestras de tejido no tumoral

Muestra	Gen	Frecuencia alélica (%)	Variante	Cambio de aminoácido	dbSNP	GnomAD
Control 1	<i>MET</i>	57.0	c.607T>A	p.(Ser203Thr)	rs200861145	0.051%
Control 2	<i>PDGFRA</i>	57.8	c.3155C>T	p.(Thr1052Met)	rs397514550	0.0179%

Por otro lado, se seleccionaron 14 muestras con alteraciones conocidas que habían sido detectadas en el momento del diagnóstico de rutina, mediante pirosecuenciación, secuenciación Sanger o inmunohistoquímica en los genes *IDH1* (10 casos), *IDH2* (2 casos) y *BRAF* (2 casos). En todas ellas las mutaciones previamente detectadas fueron confirmadas mediante la utilización del panel de NGS GLIO-30 (Tabla 11).

Tabla 11. Variantes identificadas en muestras tumorales

	Diagnóstico*	Gen	Cambio	Frecuencia alélica (%)	Validación [^]
1	Astrocitoma IDH mutado, grado III	IDH1	p.(Arg132His)	39.9	IHQ/Pirosec
2	Oligodendroglioma 1p/19q delecionado, grado II	IDH1	p.(Arg132His)	41.1	Sanger
3	Astrocitoma IDH mutado, grado III	IDH1	p.(Arg132His)	35.6	IHQ/Pirosec
4	Astrocitoma IDH mutado, grado III	IDH1	p.(Arg132His)	14.0	IHQ/Pirosec
5	Gliomatosis cerebri	IDH1	p.(Arg132His)	24.7	Pirosec
6	Astrocitoma IDH mutado, grado II	IDH1	p.(Arg132Gly)	43.5	Sanger
7	Astrocitoma IDH mutado, grado II	IDH1	p.(Arg132Leu)	20.4	Sanger
8	Astrocitoma IDH mutado, grado II	IDH1	p.(Arg132Gly)	48.7	Sanger
9	Astrocitoma IDH mutado, grado II	IDH1	p.(Arg132Gly)	34.3	Pirosec
10	Astrocitoma IDH mutado, grado III	IDH1	p.(Arg132Cys)	43.4	Pirosec
11	Oligodendroglioma 1p/19q delecionado, grado III	IDH2	p.(Arg172Lys)	62.4	Sanger
12	Oligodendroglioma 1p/19q delecionado, grado II	IDH2	p.(Arg172Lys)	24.5	Sanger
13	Astrocitoma pilocítico, grado I	BRAF	p.(Val600Glu)	30.8	Sanger
14	Astrocitoma pilocítico, grado I	BRAF	p.(Val600Glu)	18.1	Pirosec

*Diagnóstico en base a la clasificación de la OMS 2016.

[^]IHQ: Inmunohistoquímica; Sanger: secuenciación Sanger; Pirosec: pirosecuenciación.

Finalmente, los resultados de 16 casos estudiados con el panel GLIO-NGS-30 se validaron también mediante la correlación de los resultados de NGS obtenidos con el panel comercial *FoundationOne CDx* (FOCDx, *Foundation Medicine*) [77]. Dicho panel analiza un número mayor de genes que los analizados con el panel GLIO-NGS-30, pero los resultados se filtraron para comparar los mismos genes.

En cuanto a las variantes identificadas, 33 de ellas se detectaron con ambos paneles y sólo una, que fue detectada con el panel GLIO-NGS-30, no se confirmó con el panel FOCDx. Con relación a esta variante, se trata de una mutación en el gen *LZTR1* (caso 33) con un 15% de frecuencia alélica y un cambio C>T. La discrepancia entre ambos resultados podría deberse a que esta variante se encuentre presente en un porcentaje bajo de células tumorales y a que el material empleado para ambas determinaciones es diferente. Por otra parte, el tipo de cambio observado (C>T) podría detectarse como consecuencia de la fijación con formol de la muestra. Cabe resaltar que todas las variantes identificadas con el panel FOCDx si fueron identificadas con el panel GLIO-NGS-30.

Tabla 12. Variantes detectadas con el panel GLIO-NGS-30 y validación con el panel FOCDx.

Caso	Gen	Tipo de variante	Frecuencia alélica (%)	Variante	Efecto	Cambio de aminoácido
7	IDH1	SNV	25.9	c.395G>A	missense	p.(Arg132His)
7	PDGFRA	SNV	81.1	c.748C>A	missense	p.(Pro250Thr)
7	TP53	SNV	69.6	c.823T>C	missense	p.(Cys275Arg)
8	IDH1	SNV	42.8	c.395G>A	missense	p.(Arg132His)
8	QKI	SNV	30.0	c.961C>G	missense	p.(His321Asp)
8	TP53	SNV	76.8	c.488A>G	missense	p.(Tyr163Cys)
8	CIC	SNV	24.1	c.2956C>G	missense	p.(Leu986Val)
8	ATRX	INDEL	82.3	c.2129_2129delA	Frameshift Del	p.(Asn710fs)
28	EGFR	SNV	14.0	c.907G>C	missense	p.(Asp303His)
28	PIK3CA	SNV	16.5	c.2702G>T	missense	p.(Cys901Phe)
11	PIK3R1	SNV	38.5	c.1357A>C	missense	p.(Asn453His)
11	IDH2	SNV	45.8	c.515G>A	missense	p.(Arg172Lys)
12	ATRX	SNV	83.5	c.6719T>C	missense	p.(Leu2240Pro)
14	PDGFRA	SNV	13.8	c.1030C>T	missense	p.(Pro344Ser)
14	TP53	SNV	13.2	c.451C>T	missense	p.(Pro151Ser)
14	NF1	SNV	9.5	c.1277G>A	nonsense	p.(Trp426Ter)
14	CIC	SNV	11.3	c.1289C>T	missense	p.(Ala430Val)
19	DAXX	SNV	44.4	c.1024C>T	missense	p.(Leu342Phe)
19	TP53	SNV	59.9	c.644G>T	missense	p.(Ser215Ile)
32	EGFR	SNV	88.2	c.1118C>A	missense	p.(Pro373Gln)
33	EGFR	SNV	11.4	c.1766C>T	missense	p.(Pro589Leu)
33	TSC1	SNV	39.2	c.1001C>T	missense	p.(Ser334Leu)
33	LZTR1	SNV	15.0	c.2494C>T	nonsense	p.(Gln832Ter)
37	PTEN	SNV	65.2	c.479C>T	missense	p.(Thr160Ile)
39	PTEN	SNV	73.6	c.1026G>T	missense	p.(Lys342Asn)
41	PTEN	INDEL	33.9	c.676_677insC	Frameshift Del	p.(Ser227fs)
41	PIK3CA	SNV	24.2	c.1357G>A	missense	p.(Glu453Lys)
51	TP53	SNV	48.6	c.817C>T	missense	p.(Arg273Cys)
51	NF1	INDEL	41.2	c.6357_6357delA	Frameshift Del	p.(Ala2120fs)
73	Mutaciones no detectadas					
100	PIK3R1	INDEL	40.4	c.1724_1725insA	Frameshift Ins	p.(Thr576fs)
100	IDH1	SNV	36.0	c.395G>A	missense	p.(Arg132His)
100	ATRX	SNV	35.4	c.4063G>T	nonsense	p.(Glu1355Ter)
100	TP53	SNV	72.6	c.742C>T	missense	p.(Arg248Trp)
122	PTEN	SNV	10.1	c.697C>T	nonsense	p.(Arg233Ter)

SNV, Single Nucleotide Variation; INDEL, insertion/deletion; Del, Deletion; Ins, insertion.

6.1.3 Desarrollo de un método basado en el z-score para la detección de CNVs

Con el fin de determinar de manera precisa las alteraciones en el número de copias de algunos genes relevantes en gliomas, se desarrolló un método de normalización basado en el publicado por el grupo de Ligtenberg [78]. En primer lugar, para corregir las diferencias en el número de lecturas obtenidas debida a la amplificación por PCR de cada *pool* de *primers*, para cada muestra se dividieron las lecturas de cada amplicón por la mediana del total de lecturas obtenidas en cada *pool* de *primers* (*pool* 1 ó *pool* 2). Este proceso se realizó tanto en los datos obtenidos en las muestras referencia (*baseline*), como en las muestras de los tumores. Este dato es la cobertura normalizada del amplicón y se ha denominado aquí “Cob normalizada”. A continuación, se normalizó la cobertura de cada amplicón respecto a las muestras control, dividiéndose la “Cob Normalizada” de cada amplicón y muestra, por la mediana de la cobertura normalizada (“Mediana de la Cob normalizada”) de ese amplicón en el *pool* de muestras de referencia (*baseline*). Este valor da una idea del número de copias, y se denomina cobertura relativa (“Cob Relativa”). Con el fin de visualizar correctamente las deleciones, este valor se representó en escala logarítmica (Figura 21).

Por último, se obtuvieron los valores de *z-score* para cada uno de los datos de “Cob relativa” obtenidos de la siguiente manera:

$$z\ score = \frac{Z - C}{S}$$

Z = “Cob normalizada” de cada amplicón y muestra
 C = Media de “Cob normalizada” del *pool* referencia (*baseline*)
 S = Desviación estándar de “Cob normalizada” del *pool* referencia (*baseline*)

El *z-score* es una medida de significación comúnmente utilizada en la detección de la variación del número de copias a partir de datos de cobertura. Su valor representa el número de desviaciones estándar que la cobertura obtenida está por encima o por debajo de la media de los valores del grupo de referencia. Por lo tanto, este valor permitirá distinguir entre el ruido analítico debido a la técnica o una variación real del número de copias, reflejando así la significación estadística del resultado del análisis de CNVs.

Para establecer los umbrales de ganancia y de pérdida, se analizaron la media y la mediana del valor de *z-score* de los amplicones de cada gen. De acuerdo con los resultados obtenidos, se establecieron valores de *z-score* para la consideración de amplificación y deleción: amplificación cuando el promedio del valor de *z-score* superase el umbral de 20 y deleción cuando éste fuese inferior a -4. Para el gen *CDKN2A*, se estableció el umbral de deleción homocigota cuando el promedio de *z-score* fuese inferior a -6 (Figura 21).

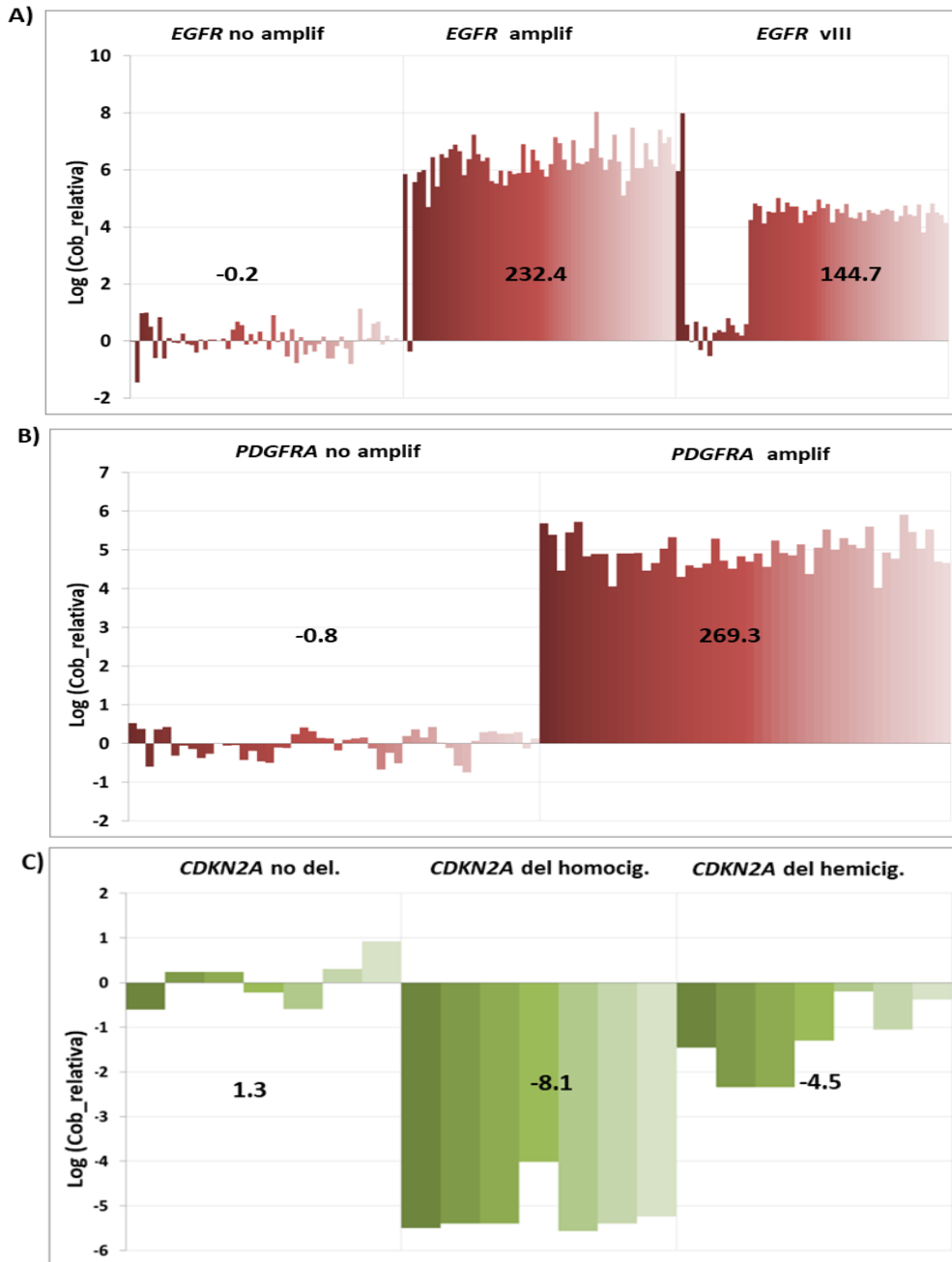


Figura 21. Estudio de CNVs mediante z-score. Se representa la cobertura relativa, Log (Cob relativa), de cada amplicón en escala logarítmica para los genes: **A)** EGFR, no amplificado (izquierda), amplificado (centro) y amplificado con la variante VIII (derecha); **B)** PDGFRA, con amplificación (derecha) y sin amplificación (izquierda); **C)** CDKN2A, no deleción (izquierda), deleción homocigota (centro) y deleción hemicigota (derecha). Se muestran los valores promedio de z-score para cada caso.

6.2. DETECCIÓN DE ALTERACIONES GENÉTICAS MEDIANTE EL PANEL DIRIGIDO DE GENES GLIO-NGS-30

6.2.1 Detección de mutaciones

Tras los filtrados descritos en la sección de Material y Métodos, se detectaron un total de 341 variantes, encontrando variantes en regiones codificantes, *missense* e INDELS *inframe* (sin alteración en el marco de lectura), y variantes en sitios de *splicing* (Figura 22). Por otra parte, las variantes se clasificaron en mutaciones patogénicas (*driver* y truncantes) o variantes de significado incierto (VUS) de acuerdo con lo descrito en la literatura [79].

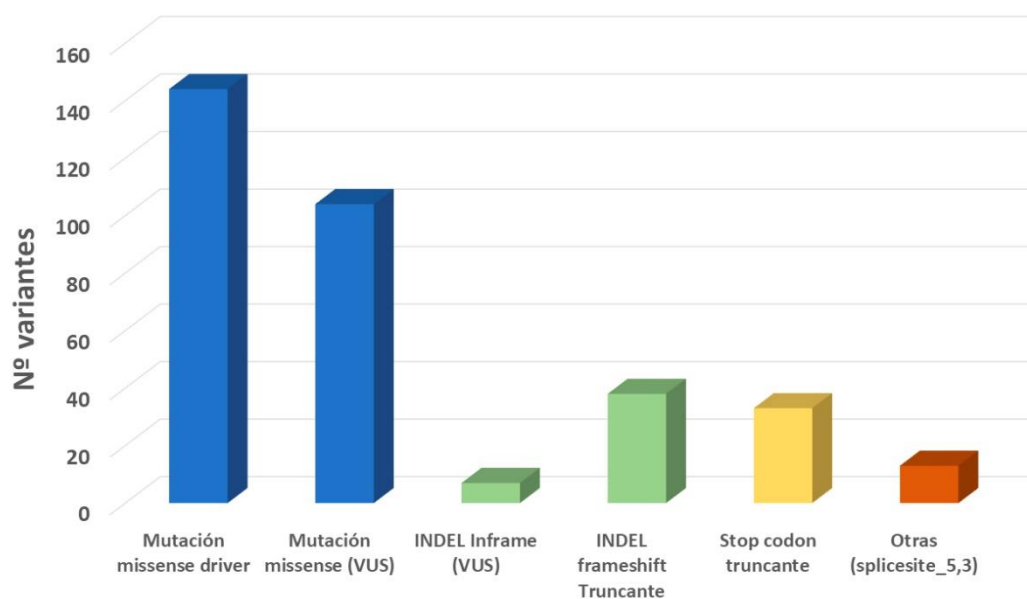


Figura 22. Frecuencia de las variantes detectadas clasificadas según el tipo de variante y efecto.

En el análisis realizado se detectaron, además de variantes en los puntos calientes de mutación (*hotspots*), otras 3 variantes en localizaciones *no hotspot* en los genes *IDH1* e *IDH2* (Tabla 13). Estas 3 variantes se encontraban registradas en la base de datos COSMIC en otros tipos tumorales como tumores de mama, gástricos y adenocarcinomas. Sin embargo, en SNC la variante de *IDH1* p.(Tyr183Cys) se ha demostrado que es una variante polimórfica mediante mutagénesis dirigida en líneas celulares de GB [80]. Así mismo, las variantes de *IDH1* p.(Arg222Cys) e *IDH2* p.(Thr435Met) se clasifican como variantes benignas según diferentes predictores de patogenicidad *in silico* (Mutationtaster y Decipher). Por otra parte, aunque en una frecuencia baja en la población, estas variantes se han detectado en individuos sanos en gnomAD [81], y la frecuencia alélica con la que fueron detectadas (entorno al 50%) sugiere que podrían ser polimorfismos. Por lo tanto, estas 3 variantes detectadas no se computaron como mutaciones de significado desconocido sino como polimorfismos.

Tabla 13. Resumen mutaciones en regiones no hotspot detectadas en los genes IDH1 e IDH2

Muestra	Gen	Cambio nucleótido	Efecto	Cambio aminoácido	COSMIC ID	Frecuencia alélica (%)	gnomAD
34	IDH1	c.548A>C	missense	p.(Tyr183Cys)	COSV61634138	33.7	0.01004
178	IDH1	c.664C>T	missense	p.(Arg222Cys)	COSV61620767	49.3	0.00002830
122	IDH2	c.1304C>T	missense	p.(Thr435Met)	COSV51561910	45.3	0.003608

Finalmente, en el análisis realizado mediante secuenciación masiva con el panel de 30 genes diseñado se detectó al menos una variante en el 89.6% de los casos de nuestra serie (164/183), con una tasa media de mutaciones puntuales por caso de 1.9. Se detectaron mutaciones en todos los genes incluidos en el panel a excepción de los genes HIST1H3B y CDKN2A (Figura 23), siendo el tipo de mutaciones detectadas con mayor frecuencia las variantes missense e INDELS (Figura 23).

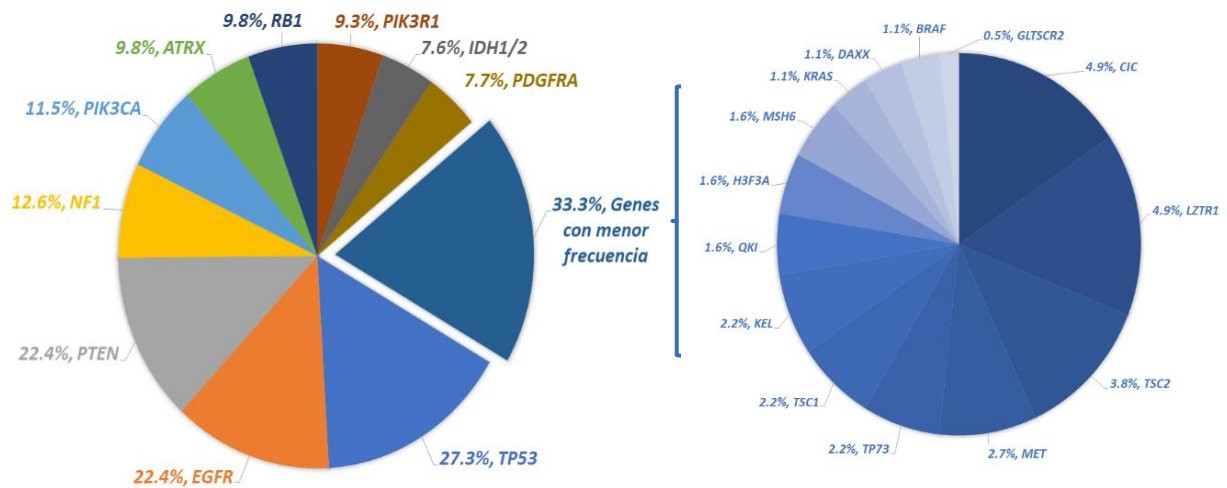


Figura 23. Frecuencia de mutaciones detectadas de cada gen del panel GLIO-NGS-30 (mutaciones puntuales e INDELS).

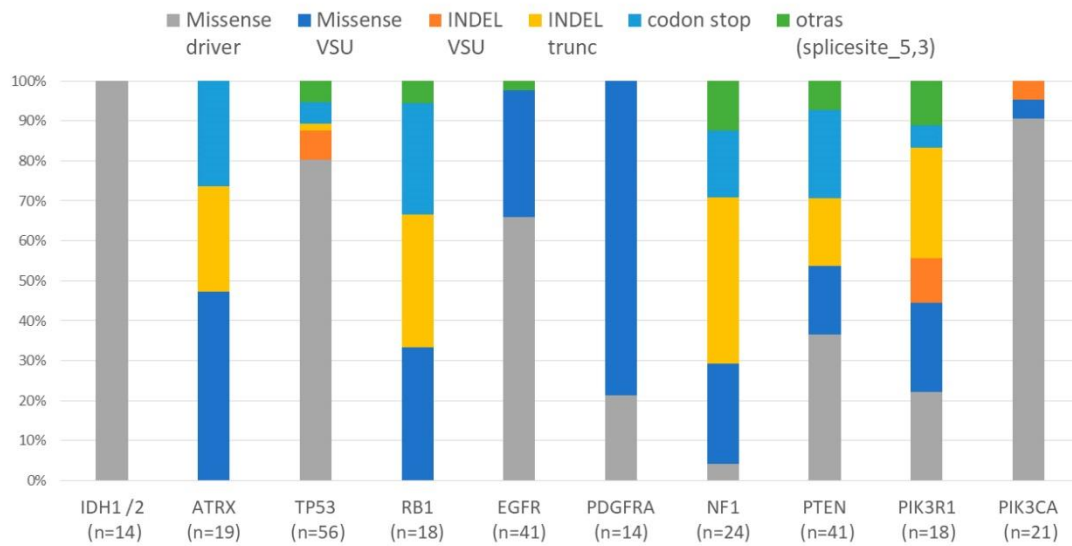


Figura 24. Tipo de mutación detectada dentro de los genes alterados con mayor frecuencia con el panel GLIO-NGS-30, Mutaciones puntuales e INDELS clasificadas en función de su efecto en la proteína y su patogenicidad.

6.2.2 Detección de CNVs

El análisis del número de copias presentes en las muestras tumorales se realizó mediante dos métodos. Por un lado, se analizó el resultado proporcionado por el software de análisis *Ion Reporter* (IR) y, por otro lado, se realizó el análisis de CNVs mediante la aplicación del método basado en el z-score detallado anteriormente.

6.2.3 Análisis de CNVs con el software Ion Reporter (IR)

El análisis del número de copias presentes en las muestras tumorales se realizó mediante la comparación de la cobertura obtenida en dichas muestras con una referencia de dotación 2n. Dicha referencia se generó a través del análisis de cobertura de 10 muestras no tumorales que fueron empleadas para la realización de una línea base (*baseline*) con el software IR. De esta manera, los datos de cobertura en muestras tumorales se comparan con esta referencia generada para detectar ganancias o pérdida de material genético. Este análisis de CNVs se realizó en un total de 182 casos de los 183 secuenciados, no pudiéndose realizar en una muestra debido a la baja uniformidad de la cobertura obtenida en este caso.

Los resultados obtenidos mostraron que un 35.2% de los casos analizados (64/182) presentaron amplificación del gen *EGFR*. Mediante el análisis realizado con este método, no se pudo determinar la presencia de ganancia génica de bajo número de copias. Tampoco se pudieron detectar las variantes del gen *EGFR*, como la variante *EGFR VIII*, en aquellos casos amplificados. En cuanto a las amplificaciones del gen *PDGFRA*, 17 de los pacientes analizados (9.3%) mostraron amplificación (Figura 25A). Con respecto al estudio de deleciones, se detectó deleción homocigota del gen *CDKN2A* en 12 casos (6.6%) y deleción hemicigota (x1 copia) en 28 (15.4 %).

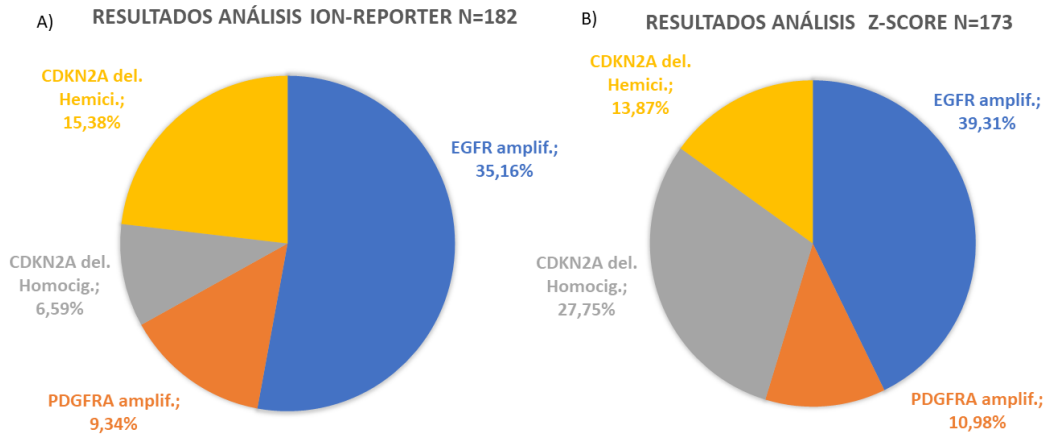


Figura 25. Frecuencia de CNVs obtenidos mediante el software IR (A) y método z-score (B).

6.2.4 Análisis de CNVs mediante el método de z-score

El análisis de las alteraciones en el número de copias se realizó en un total de 173 casos de los 183 estudiados mediante el análisis del valor de z-score descrito anteriormente. En 10 casos no se pudo realizar este análisis debido a la diferencia en uniformidad de lecturas obtenida para cada uno de los *pools* que conforman el panel GLIO-NGS-30.

La presencia de amplificación del gen *EGFR* se detectó en 68 de las 173 muestras analizadas (39.3%) (Figura 25B y Figura 26). Además, este análisis de CNVs permitió detectar las diferentes variantes producidas por la delección de algunos exones, como la variante *EGFR* VIII, el reordenamiento más común en GB generado por la delección de los exones 2 al 7 del gen (5 casos); la variante *EGFR* vV (delección de los exones 25-28) (1 caso); y la variante *EGFR* VII (delección de los exones 14-15) (2 casos) (Figura 27).

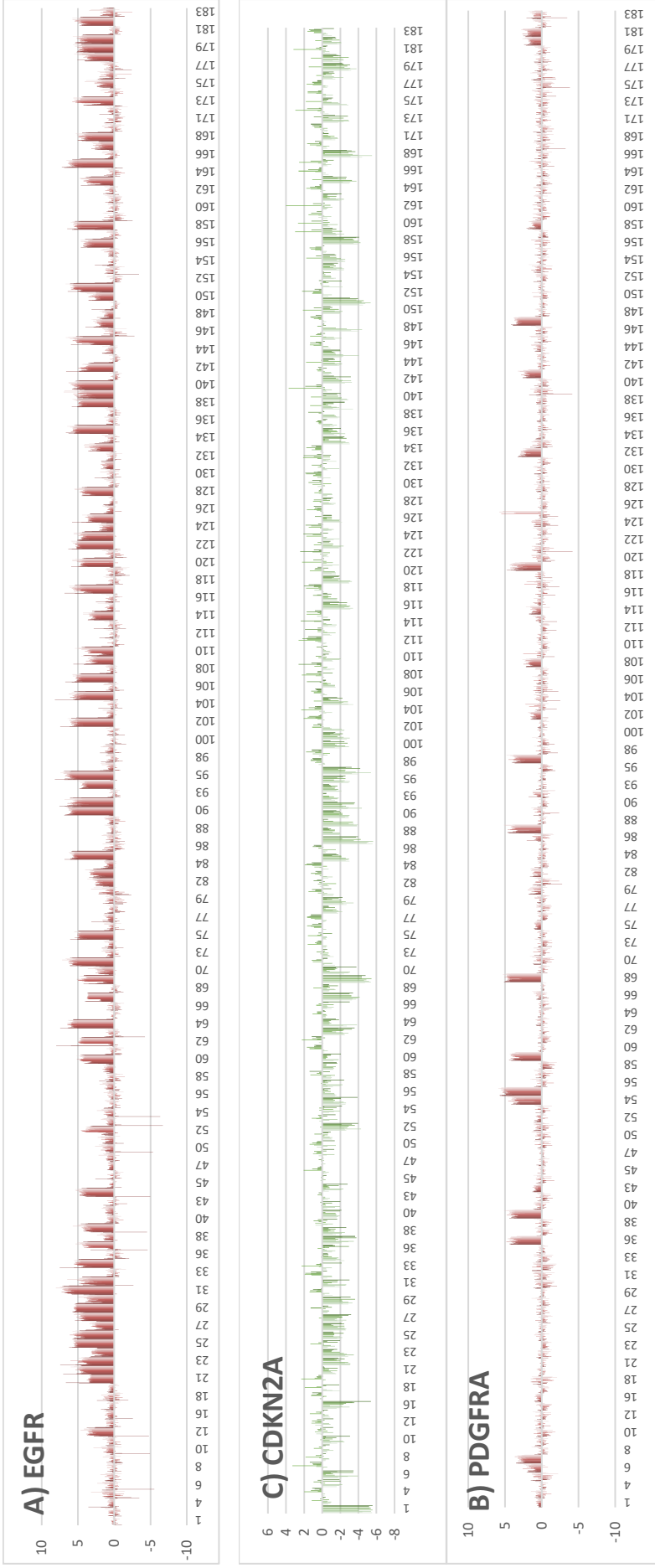


Figura 26. Análisis de CNVs. Representación gráfica del log (cob relativa) para cada muestra del estudio en los genes: A) EGFR, B) PDGFRA, C) CDKN2A

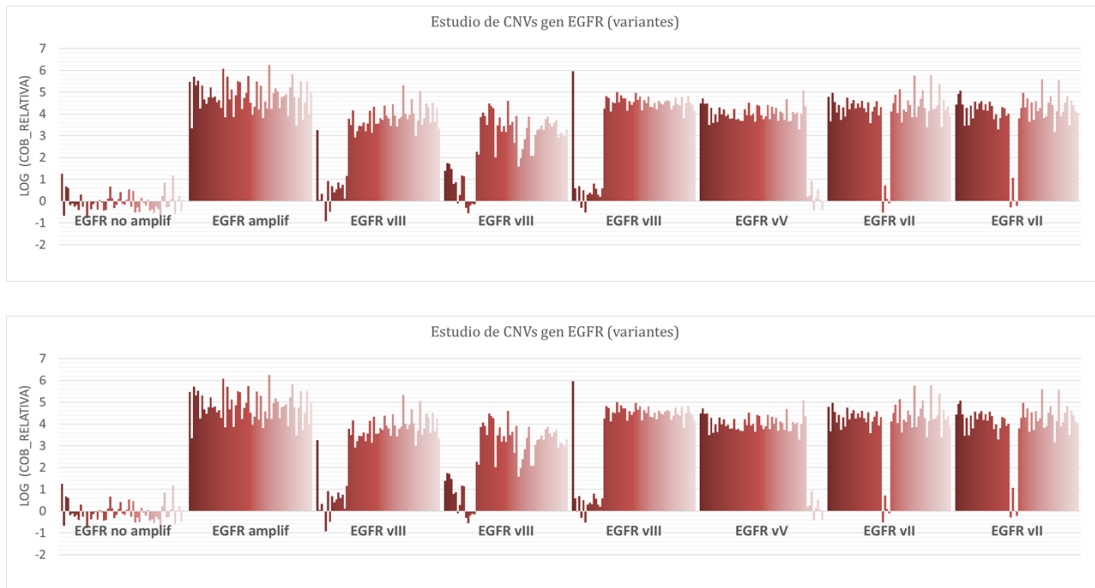


Figura 27. Representación gráfica en escala logarítmica de la cobertura relativa (Cob relativa). Se muestran distintos casos de tumores sin amplificación de EGFR y con amplificación, así como las distintas variantes amplificadas de EGFR: variante VIII (delección de los exones 2-7); variante vV (delección de los exones 25-28); variante VII (delección de los exones 14-15).

Del mismo modo, se detectaron 19 casos con amplificación o ganancia de alto nivel del gen PDGFRA (11%) (Figura 25B y Figura 26) .

En cuanto a las alteraciones en el número de copias del gen CDKN2A, 72 de las muestras analizadas (41.6%) presentaron delección. . De acuerdo con los umbrales establecidos, 48 (66,6%) de estas muestras mostraron una delección en homocigosis del gen y 24 (33,3%) mostraron una delección de una sola copia (hemicigosis) (Figura 25B). Sin embargo, aunque con este método se establecieron delecciones hemicigotas en algunos de los casos, la fiabilidad de estos resultados depende tanto del porcentaje de células tumorales con delección hemicigota presentes en la muestra, como de la calidad de la propia muestra y la cobertura obtenida.

Finalmente, mediante el método desarrollado no se pudieron detectar alteraciones en el número de copias de otros genes como NF1, RB1, PTEN o TP53, ya que no se pudieron establecer criterios robustos para la determinación de ganancias o pérdidas de bajo nivel.

6.2.5 Comparativa de los métodos utilizados para el análisis de CNVs

Se realizó un análisis comparativo de los resultados obtenidos mediante ambos métodos de análisis de CNVs, el software IR y el método del z-score. Los resultados obtenidos de este análisis se muestran en la Tabla 14 y Figura 28.

Tabla 14. Comparativa de los resultados obtenidos en el estudio de CNVs con el software IR y mediante el análisis del z-score.

	IR	z-score
EGFR		
AMPLIFICADO	64	67
VARIANTES (EGFR vIII, vV, vII)	NA	8
NO AMPLIFICADO	109	106
PDGFRA		
AMPLIFICADO	17	19
NO AMPLIICADO	156	154
CDKN2A		
DELECIÓN HOMOCIGOTA	12	48
DELECIÓN HEMICIGOTA	26	24
NO DELECIÓN	135	101

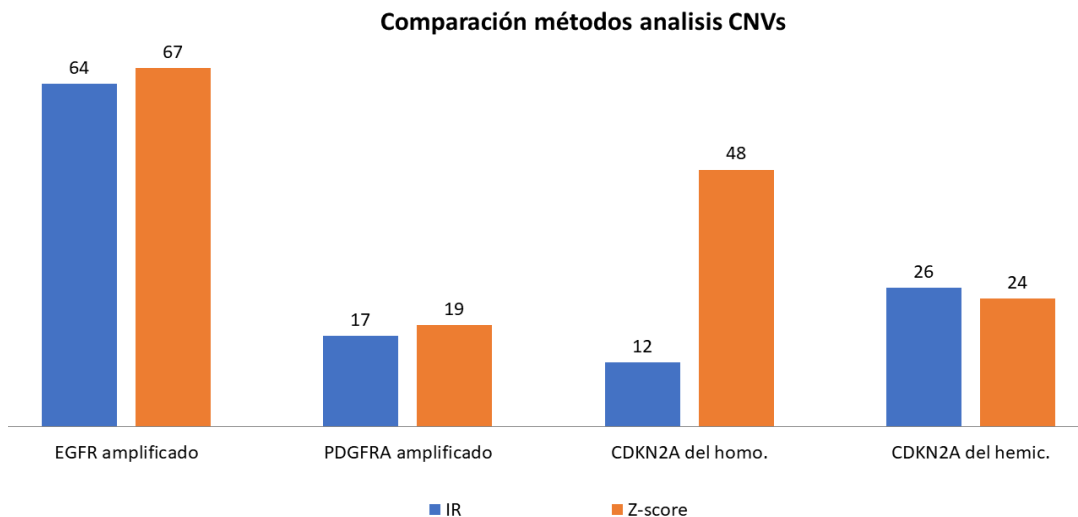


Figura 28. Comparativa de los resultados obtenidos en el estudio de CNVs con el software IR (azul) y mediante el análisis del z-score (naranja). Del homo.: delección homocigota; del hemic.: delección hemicigota.

Como puede observarse, en 3 de los 67 casos con amplificación de *EGFR* detectada mediante el método z-score no se detectó la amplificación mediante el software IR. En estos casos, el software IR los reportó con un valor de menos de x10 (valor máximo obtenido por el sistema y que se asimila a amplificación de alto nivel), no pudiéndose determinar, por tanto, una amplificación de alto nivel por este

método. Del mismo modo, 2 de los 19 casos con amplificación del gen *PDGFRA* detectada mediante el análisis de *z-score* no pudieron detectarse mediante la utilización del *software* IR, ya que el valor obtenido era inferior a lo considerado como amplificación (x10).

Respecto a las deleciones, cabe destacar la mayor tasa de deleciones homocigotas del gen *CDKN2A* detectada mediante el método *z-score* (48 casos) con respecto la obtenida mediante el *software* IR (12 casos) (Tabla 14 y Figura 28). Además, de los 135 casos en los que el *software* IR no detecta deleción, 25 y 16 casos tienen deleciones homocigota y hemicigota, respectivamente, mediante el método de *z-score*. Así mismo, de los 26 casos detectados con una deleción hemicigota del gen *CDKN2A* mediante el *software* IR, 12 resultaron en deleción homocigota y 7 no mostraron deleción mediante el método *z-score*. Por otro lado, 1 de los 12 casos con deleción homocigota detectado por IR mostró una deleción hemicigota mediante el método *z-score*.

6.2.6 Validaciones de CNVs realizadas con métodos ortogonales

Con el fin de determinar la fiabilidad de los métodos de detección de CNVs, los resultados obtenidos mediante los métodos IR y *z-score* se compararon con los obtenidos mediante otros métodos ortogonales en una fracción representativa de las muestras: FISH (36 casos), MLPA (12 casos) y un panel de NGS validado para diagnóstico, el panel FoundationOne CDx (14 casos).

En concreto, se analizaron 31 y 5 muestras mediante FISH con sondas específicas de los genes *EGFR* y *CDKN2A*, respectivamente (Tabla 15). De los 31 casos analizados para *EGFR*, todos los casos a excepción de uno mostraron resultados concordantes con ambos métodos IR ó *z-score* (17 amplificados y 13 no amplificados). En un caso se identificó una amplificación focal mediante FISH que no se detectó por ninguno de los métodos IR ó *z-score*. La ausencia de detección en ese caso puede deberse a la escasez de células tumorales con la amplificación presentes en el tejido analizado mediante NGS.

Por otra parte, de los 5 casos analizados para el gen *CDKN2A*, todos mostraron resultados concordantes mediante FISH y el método *z-score* (4 con deleción homocigota y 1 sin deleción). Sin embargo, la concordancia de la FISH con el método IR fue menor, y sólo 2 de los casos mostraron resultados concordantes, mientras que 3 casos que presentaban deleción homocigota por FISH no fueron detectados mediante el método IR. Por tanto, para la detección de deleciones, el método del *z-score* es el que mostró mayor sensibilidad y concordancia en los resultados obtenidos con el FISH.

Tabla 15. Correlación de los resultados obtenidos por FISH, IR y z-score

	FISH	IR	z-score
EGFR (n=31)			
Amplificado	17	17	17
Amplificación focal	1	0	0
No amplificado	13	13	13
CDKN2A (n=5)			
Delección homocigota	4	1	4
No delección	1	4	1

El análisis comparativo realizado de los métodos de detección de CNVs (IR y z-score) con el método ortogonal MLPA para la detección de deleciones del gen *CDKN2A* se realizó en 12 tumores de los cuales se disponía de resultado tras el análisis del tejido tumoral congelado (Caso).

Tabla 16. Resumen de los resultados obtenidos mediante MLPA, IR y z-score Correlación entre los resultados obtenidos mediante MLPA y los métodos de detección de CNVs mediante NGS, IR y z-score.

Caso	MLPA	IR	z-score*
67			-7.7
1			-8.1
163**			-5.5
16			-6.2
25			-5.7
148			-5.4
21			-4.5
178			-4.5
45			-0.4
47			-0.1
4			1.1
62			1.8

*Se indican los valores promedio de z-score obtenidos para cada caso. **ADN extraído de material congelado para MLPA y de parafina para NGS. En verde oscuro se indica el resultado de delección homocigota, en verde claro delección hemocigota y en amarillo no deleccionado.

De los 3 casos con delección homocigota mediante MLPA, sólo un caso fue detectado por el *software* IR con delección homocigota, mientras que los otros dos fueron negativos (no deleccionados). Atendiendo a las deleciones hemocigotas detectadas mediante MLPA en 5 casos, 4 presentaron resultados discrepantes mediante el *software* IR, dos con delección homocigota y dos sin delección.

Con respecto a la correlación de los resultados de MLPA con el método z-score, de los tres casos con delección homocigota del gen mediante MLPA, sólo uno fue discordante, presentando delección hemocigota con z-score. Esta discrepancia puede deberse a que el tejido utilizado para la realización de la técnica MLPA en este caso fue tejido congelado, mientras que la técnica de NGS se realizó en tejido incluido en parafina (FFPE). Por otra parte, de los cinco casos con delección hemocigota mediante MLPA, cuatro mostraron resultados concordantes mediante el método z-

score y uno de esos cinco casos resultó con delección homocigota mediante este método. Este caso discrepante presenta un valor promedio z-score de 6.2, cercano al límite entre la consideración de delección homocigota y hemicigota.

Respecto a las muestras sin delección mediante la técnica de MLPA (4 casos), todas detectadas como negativas (sin delección) mediante ambos métodos empleados, IR y z-score.

Por último, se correlacionó el resultado obtenido mediante secuenciación masiva con el panel FoundationOne CDx con los métodos de detección de CNVs, el software IR y el método z-score para 14 casos (Tabla 17). Los resultados obtenidos mostraron buena correlación para la detección de amplificación en los genes *EGFR* y *PDGFRA* en los 14 casos, a pesar de que el software IR no permite detectar las distintas variantes de amplificación de *EGFR*. Sin embargo, para la detección de delección del gen *CDKN2A*, no pudo detectarse ninguna delección mediante IR, mientras que el método de z-score detectó 2 de los 5 casos delecionados mediante el panel de FoundationOne CDx. Esta discrepancia podría deberse a diferencias en el tejido analizado (diferentes cortes del tumor) así como diferencias en la tecnología de secuenciación masiva empleada, ya que FoundationOne CDx emplea tecnología de captura mientras que la tecnología empleada en el panel GLIO-NGS-30 es de amplicones.

Tabla 17. Correlación de los resultados obtenidos mediante el panel FoundationOne CDx, IR y z-score

	FoundationOne CDx	IR	z-score
EGFR (14 casos)			
Amplificado	6	6	6
<i>EGFR</i> vIII	1	NA	1
No amplificado	8	8	8
PDGFRA (14 casos)			
Amplificado	2	2	2
No amplificado	12	12	12
CDKN2A (14 casos)			
Delección homocigota	5	0	2
Delección hemicigota	NA	1	0
No delección	9	13	12

6.3. ANÁLISIS DE LOS MARCADORES MOLECULARES TERT Y MGMT

Las mutaciones en el promotor del gen *TERT* pudieron analizarse en 171 de los 183 casos incluidos en este estudio (en 12 casos los resultados no fueron concluyentes por material insuficiente o de mala calidad). De los 171 casos analizados, 117 presentaron mutaciones en el promotor del gen *TERT* (68.4%). De estos, 80 casos presentaron la mutación C228T (68.3%) y 37 casos la mutación C250T (31.6%).

Por otro lado, se analizó la metilación del promotor del gen *MGMT* en 109 de los 183 casos estudiados, no pudiéndose obtener resultados concluyentes o material suficiente en 67 casos. De los 109 pacientes analizados, 58 casos fueron positivos para la metilación del promotor de *MGMT* (53.2%).

6.4. RESUMEN DE LAS ALTERACIONES MOLECULARES IDENTIFICADAS MEDIANTE NGS EN LA SERIE DE GLIOMAS ANALIZADA Y COMPARACIÓN CON BASES DE DATOS EXTERNAS

Teniendo en cuenta los resultados de mutaciones (INDELS y mutaciones puntuales) y CNVs obtenidos mediante secuenciación con el panel GLIO-NGS-30, el 96.2% de los casos estudiados (176/183) mostraron alguna alteración (mutaciones y/o CNVs) en alguno de los genes analizados, mientras que en el 3.8% (7 casos) no se detectó ninguna alteración (Figura 29).

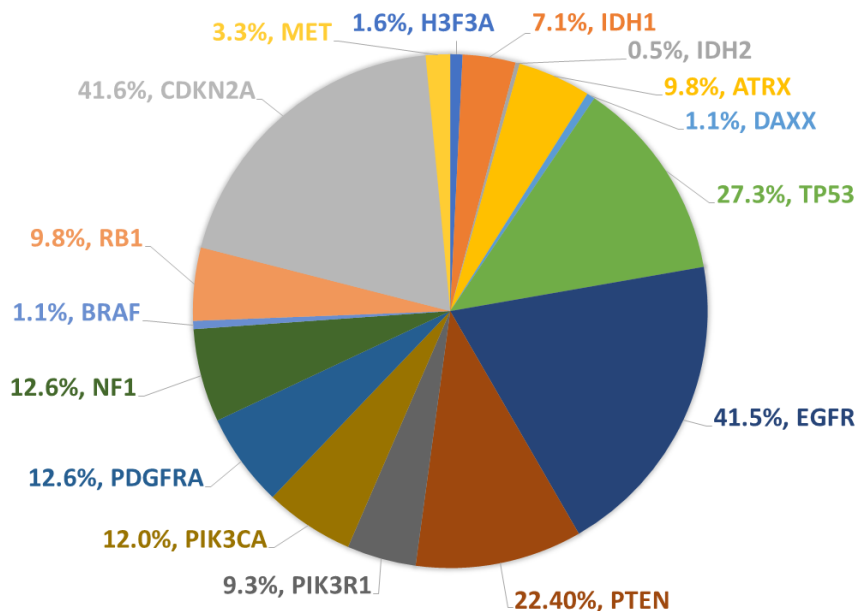


Figura 29. Resultados globales (mutaciones y CNVs) detectados mediante secuenciación masiva con panel GLIO-NGS-30 en 183 glioblastomas. Se representan sólo los genes más relevantes implicados en las principales rutas de señalización.

Estos resultados mostraron que las alteraciones en los genes *EGFR* y *TP53* eran excluyentes entre sí, mientras que las mutaciones en los genes *IDH1*, *TP53* y *ATRX* aparecen de manera concomitante, así como las alteraciones en los genes *EGFR* y *CDKN2A* o los genes *IDH1* y *QKI* (Tabla 18).

Tabla 18. Estudio de concurrencia de las alteraciones en los genes A vs B

A	B	NINGUNO	A NO B	B NO A	AMBOS	LOG2 (ODDS RATIO)	P-VALUE	Q-VALUE	TENDENCIA
<i>IDH1</i>	<i>TP53</i>	129	3	39	12	>3	<0.001	0.003	Concomitancia
<i>CDKN2A</i>	<i>EGFR</i>	75	20	43	45	1.972	<0.001	0.003	Concomitancia
<i>ATRX</i>	<i>TP53</i>	127	5	38	13	>3	<0.001	0.005	Concomitancia
<i>ATRX</i>	<i>IDH1</i>	157	11	8	7	>3	<0.001	0.008	Concomitancia
<i>EGFR</i>	<i>TP53</i>	58	74	37	14	-1.754	<0.001	0.023	Exclusividad
<i>IDH1</i>	<i>QKI</i>	168	12	0	3	>3	<0.001	0.023	Concomitancia

*Diferencias estadísticamente significativas ($p>0.05$)

Las frecuencias de alteración de los genes analizados mediante el panel GLIO-NGS-30 se compararon con los datos publicados en la base de datos del TCGA en GB, en la serie PanCancerAtlas, que cuenta con 592 muestras (Figura 30). Se seleccionaron aquellas muestras con estudio realizado de mutaciones y CNVs en los genes estudiados en el panel GLIO-NGS-30 y de las que se disponía de datos clínicos de supervivencia (536 muestras en total).

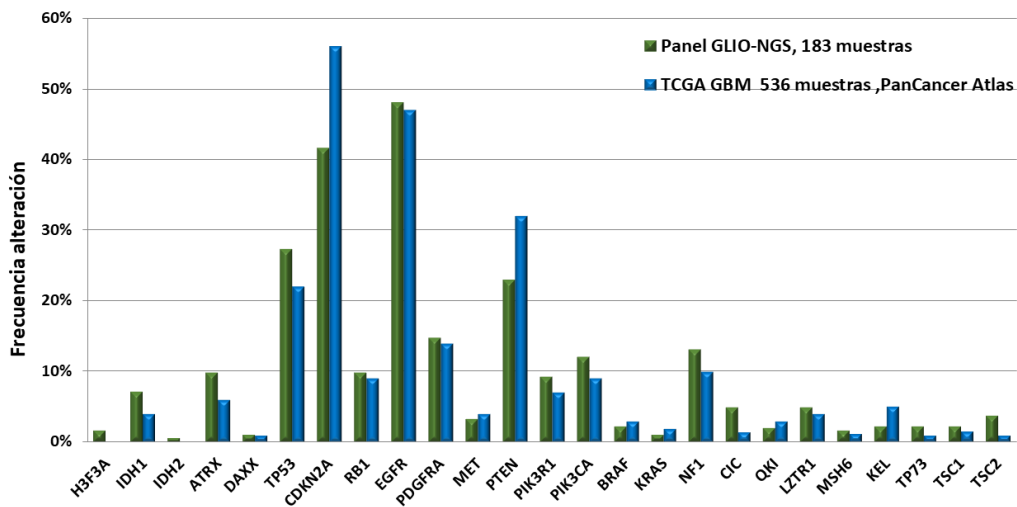


Figura 30. Comparación de la frecuencia de alteraciones detectadas en la serie estudiada con el panel GLIO-NGS-30 frente a los resultados publicados en la base de datos TCGA de la serie de GB PanCancerAtlas.

En general, no se encontraron grandes diferencias en cuanto a la frecuencia de alteraciones para la mayor parte de los genes estudiados, confirmando así los resultados obtenidos en nuestra serie. Cabe destacar, sin embargo, que un 56% de los pacientes incluidos en el TCGA presentaba deleciones en el gen *CDKN2A* frente al 41.6% detectado en la serie aquí estudiada. Esta diferencia podría deberse a las diferencias en las tecnologías empleadas para la detección de CNVs, que en la serie

del TCGA se realiza mediante *Microarrays* de SNPs. Esto mismo ocurre para las alteraciones del gen *PTEN*, en las que un 32% de los casos del TCGA presentaban alteraciones en dicho gen (mutaciones y CNVs) frente a un 22.4% en la serie aquí estudiada. Estas diferencias se deben a que en este estudio no se han recogido las deleciones de *PTEN* dada la poca robustez de los resultados de CNVs para *PTEN* mediante el método de CNVs empleado. La comparación de las mutaciones detectadas para *PTEN* entre ambas series, sin embargo, muestra que los resultados obtenidos son comparables, con un 22.4% de los casos de la serie aquí estudiada mutados y un 23.3% en la serie del TCGA (Tabla 19).

Tabla 19. Frecuencia de alteraciones detectadas en la serie estudiada con el panel GLIO-NGS-30 y en la de la serie de GB PanCancerAtlas (TCGA)

GEN	PANEL GLIO-NGS-30 (N=183)		TCGA PAN CANCER ATLAS (N=592)	
	Mutación (%)	CNV (%)	Mutación (%)	CNV (%)
<i>H3F3A</i>	1.6	N/A	0.5	N/A
<i>IDH1</i>	7.1	N/A	4.0	N/A
<i>IDH2</i>	0.5	N/A	0.5	N/A
<i>ATRX</i>	9.8	N/A	6.0	N/A
<i>DAXX</i>	1.1	N/A	1.0	N/A
<i>TP53</i>	27.3	N/A	22.0	N/A
<i>CDKN2A</i>	0.0	41.6	0.6	56.0
<i>RB1</i>	9.8	N/A	9.0	N/A
<i>EGFR</i>	22.4	39.3	19.8	42.1
<i>PDGFRA</i>	7.6	11.0	3.8	12.7
<i>MET</i>	2.7	N/A	4.0	N/A
<i>PTEN</i>	22.4	N/A	23.3	9.4
<i>PIK3R1</i>	9.3	N/A	7.0	N/A
<i>PIK3CA</i>	11.5	N/A	9.0	N/A
<i>BRAF</i>	1.1	N/A	3.0	N/A
<i>NF1</i>	12.6	N/A	10.0	N/A

6.5. ANÁLISIS DE LOS FACTORES ASOCIADOS A LA SUPERVIVENCIA DE LOS PACIENTES

6.5.1 Características clínicas de los pacientes y su asociación con la supervivencia global

En primer lugar, y debido a que una parte importante de los pacientes incluidos en la serie estudiada (109 pacientes) habían sido diagnosticados entre el año 1998 y 2015 con sistemas de clasificación diferentes al utilizado a partir de la actualización de 2016, se realizó una reevaluación de todos los casos. Además, dada la publicación de la nueva clasificación de la OMS de 2021, todos los casos se reclasificaron y se renombraron de acuerdo con esta última. De esta manera, 15 de los pacientes presentaron mutaciones en los genes IDH, y por lo tanto, estos tumores en vez de denominarse GB IDH-mutado (clasificación de 2016), corresponden ahora a tumores con un diagnóstico de astrocitoma IDH-mutado grado 4. Por el contrario,

168 pacientes que no presentaron mutación en IDH ó *H3F3A* corresponden con un GB IDH-no mutado según la clasificación de 2021.

Por tanto, siguiendo los criterios de inclusión e exclusión establecidos en la sección de *Materiales y Métodos*, los estudios comparativos entre LTS y Non-LTS se realizaron en un total de 157 pacientes, que se dividieron en dos grupos en función de la SG. (i) *Grupo LTS*: 39 pacientes con supervivencia mayor o igual a 36 meses. (ii) *Grupo Non-LTS*: 118 pacientes con supervivencia menor a 36 meses. Cabe destacar la supervivencia extremadamente larga de algunos pacientes dentro del grupo LTS, siendo de más de 60 meses en un 51.2% de éstos (20/39).

Los datos clínicos globales de estos pacientes se muestran en la Tabla 20 a continuación.

Tabla 20. Resumen de las características clínicas de los 157 pacientes incluidos en el estudio comparativo entre LTS y Non-LTS

	Nº Pacientes	
<i>Hombre / Mujer</i>	98 (62.4%) / 59 (37.6%)	
<i>Mediana de edad (rango), años</i>	60 (22-86)	
<i>Pacientes por debajo de 60 años (%)</i>	81 (51.6%)	
<i>Media SG ± Desviación estándar, meses</i>	28.69 ± 30.35	
<i>Mediana SG (rango), meses</i>	17.5 (3.1 - 214.1)	
<i>Fallecidos/Vivos</i>	150 / 7	
<i>Diagnóstico histopatológico</i>		
<i>GB IDH-no mutado</i>	144	(91.7%)
<i>Astrocitoma IDH-mutado, grado 4</i>	4	(2.5%)
<i>Gliosarcoma</i>	2	(1.2%)
<i>GB de células gigantes</i>	7	(4.4%)

En esta serie, el 62.4% (98/157) de los pacientes eran varones y 37.6% (59/157) mujeres, con una relación hombre:mujer de 1.6. La relación hombres/mujeres en ambos grupos, LTS y Non-LTS, fue de 1.6 y 1.86, respectivamente, mostrando un ligero incremento de varones en el grupo Non-LTS.

Respecto a edad, la mediana de los pacientes dentro del grupo LTS fue significativamente menor (51 años) que en el grupo de Non-LTS (62 años). Además, el 74.3% de los pacientes dentro del grupo LTS tenían menos de 60 años, frente al 44.1% de los pacientes dentro del grupo Non-LTS (p=0.0015) (Tabla 21).

Tabla 21. Resumen datos clínicos de las series LTS vs Non-LTS

	Non-LTS	LTS	LTS >60 meses
Hombre / Mujer	74 / 44	24 / 15	11 / 9
Mediana de edad (rango), años	62 (29-86)	51 (22-72)	42 (22-72)
Pacientes por debajo de 60 años (%)*	52 (44.1%)	29 (74.3%)	17 (85%)
Media SG ± SD, meses	15.1 ± 8.3	69.8 ± 37.1	92.0 ± 40.5
Mediana SG (rango), meses	14.1 (3.1 - 34.5)	60.1 (36.0 - 214.0)	74.2 (60.1 - 214.0)
Fallecidos/Vivos	118 / 0	33 / 6	15 / 5
Diagnóstico histopatológico			
GB IDH-no mutado	117 (99.2%)	36 (92,3%)	17 (85%)
Astrocitoma IDH-mutado, grado 4	1 (0.8%)	3 (7.6%)	3 (15%)
Nº Casos	118	39	20

*Diferencias estadísticamente significativas (p<0.05)

Respecto al resto de variables clínicas, los resultados en cada grupo de supervivencia se muestran a continuación en la Tabla 22.

Tabla 22. Resumen de los datos clínicos de localización, resección y sintomatología al diagnóstico

	Todos los casos		LTS		Non-LTS	
	nº	%	nº	%	nº	%
Localización tumoral						
Temporal	53	39.0	14	35.9	39	40.2
Parietal	36	26.5	11	28.2	25	25.8
Frontal	44	32.4	14	35.9	30	30.9
Occipital	8	5.9	4	10.3	5	5.2
Otros (cuerpo calloso, insular, intramedular, multicéntrico)	7	5.1	0	0.0	7	7.2
Total	136		39		97	
Resección						
Radical (>95%)*	67	44.4	20	52.6	47	41.6
Subtotal (85-95%)*	23	15.2	11	28.9	12	10.6
Parcial (50-85%)	47	31.1	7	18.4	40	35.4
Biopsia	14	9.3	0	0.0	14	12.4
Total	151		38		113	
Síntomas al diagnóstico						
Epilepsia*	31	24.4	14	36.8	17	19.1
Crisis Motora	21	16.5	4	10.5	17	19.1
Alteración en el lenguaje	12	9.4	4	10.5	8	9.0
Alteración de la conducta	14	11.0	10	7.9	11	12.4
Cefalea	37	29.1	10	26.3	27	30.3
Otros (visual, mareos)	12	9.4	3	7.9	9	10.1
Total	127		38		89	

*Diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) entre LTS y Non-LTS

La localización más frecuente en la que se encontraron las lesiones tumorales fue en el área temporal (39% de los casos), seguido de la localización frontal (32%) y la localización parietal (26%) (Tabla 22), no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de supervivencia con respecto a la localización tumoral ($p > 0.05$). La asociación de la localización tumoral con respecto a la supervivencia se analizó también mediante las curvas de Kaplan-Meier para la SG de los pacientes estratificados en función de la localización tumoral, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas (Figura 31).

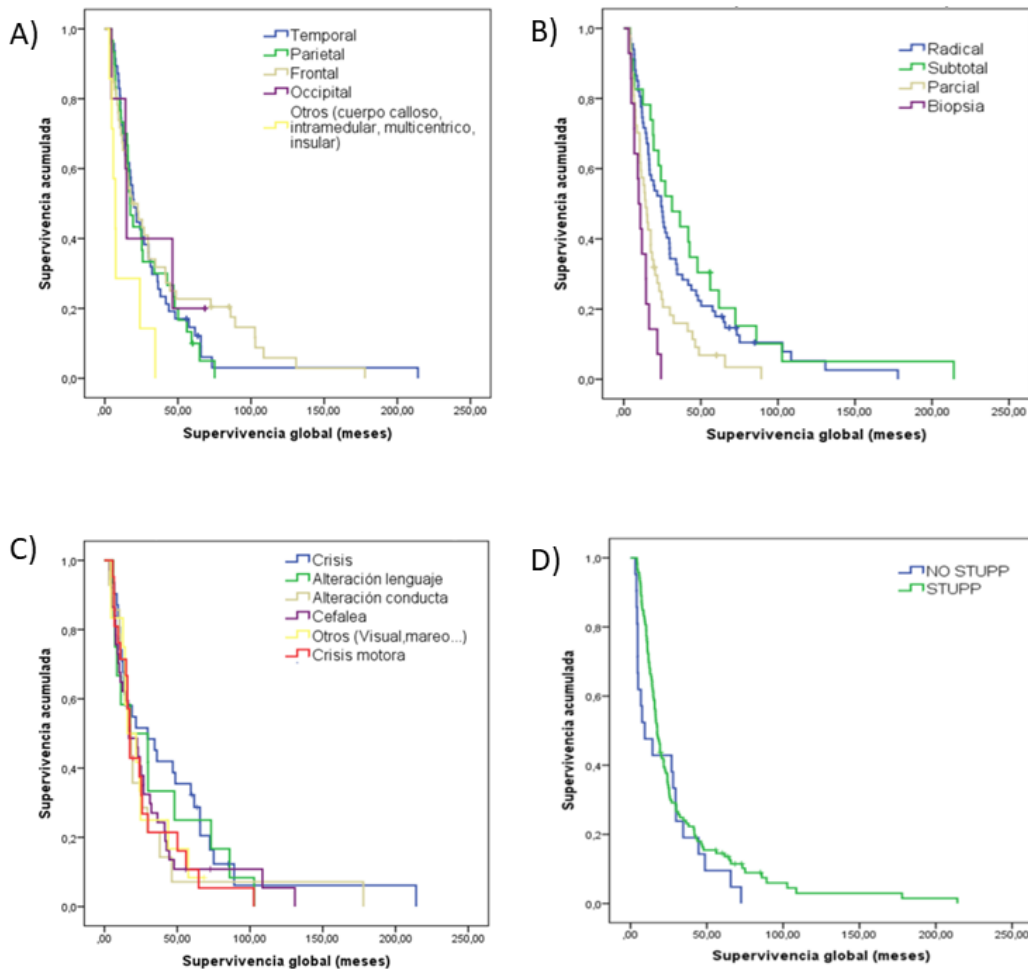


Figura 31. Curva de supervivencia global (Kaplan-Meier) de los pacientes incluidos en el estudio estratificados en función de: (A) localización tumoral; (B) tipo de resección del tumor; (C) sintomatología al diagnóstico y (D) tratamiento recibido.

Con respecto al porcentaje de tumor extirpado durante la cirugía, el 44% de los pacientes incluidos (67/151) tuvieron una resección radical (>95%) y el 15% (23/151) una resección subtotal (85-95%). Es decir, el 59.6% (90/151) de los pacientes tuvieron una resección radical y/o subtotal del tumor. Por otro lado, el 31.1% (47/151) tuvieron una resección parcial del tumor y sólo al 9.3% (14/151) de los pacientes se les realizó una biopsia estereotáctica sin realizarse cirugía posterior del tumor (Tabla 22).

Teniendo en cuenta el grado de resección tumoral en los distintos grupos de supervivencia, el 81.5% de los pacientes incluidos en el grupo LTS tuvieron una resección subtotal/radical frente al 52.2% de los pacientes incluidos en el grupo Non-LTS, siendo estadísticamente significativa esta diferencia ($p=0.0002$). Por otro lado, sólo 18.4% de los pacientes incluidos en el grupo LTS tuvieron una resección parcial o biopsia estereotáctica del tumor frente al 47.7% de los pacientes incluidos en el grupo Non-LTS ($p=0.0020$). Analizando el tipo de resección subtotal y radical por separado, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de estos tipos de resección entre los grupos LTS y Non-LTS (Tabla 22).

Con el fin de estudiar la asociación del tipo de resección tumoral con respecto a la SG de los pacientes, éstos se estratificaron en función del grado de resección del tumor y se analizaron las curvas de Kaplan-Meier. Los resultados mostraron que aquellos pacientes con resección radical, así como aquellos con resección subtotal presentaron supervivencias más largas con respecto a aquellos pacientes que tuvieron una resección parcial o biopsia estereotáctica del tumor ($p=0.000$) (Figura 31). Cabe destacar que todos los pacientes a los que se les realizó una biopsia estereotáctica tuvieron una supervivencia menor a 36 meses. De nuevo, mediante este método no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre aquellos pacientes con resección radical y resección subtotal.

Tabla 23. Mediana de supervivencia global en función del tipo de resección

Tipo de resección	Mediana SG	Intervalo de confianza de 95 %	
		Límite inferior	Límite superior
Radical (100%)	24,23	17,13	31,33
Subtotal (85-95%)	31,30	11,84	50,75
Parcial (50-85%)	14,10	10,79	17,40
Biopsia	9,60	6,55	12,64

En relación con los síntomas iniciales en el momento del diagnóstico, los síntomas más frecuentes fueron cefalea (29%), episodios de epilepsia (24%) y alteraciones motoras (16%) (Tabla 22). Se observó un mayor porcentaje de pacientes con episodios de crisis epilépticas en el debut de la enfermedad dentro del grupo LTS (36.8%) frente al grupo Non-LTS (19.1%) ($p=0.0428$). Sin embargo, el análisis de las curvas de Kaplan-Meier no mostró una diferencia estadísticamente significativa en función del síntoma al diagnóstico($p=0.575$) (Figura 31).

Finalmente, el análisis de las diferencias entre grupos en función del tipo de tratamiento recibido tras la cirugía (este dato pudo obtenerse en 140 pacientes de los 157 incluidos en el estudio de supervivencia) reveló que el 76.9% (30/39) de los pacientes LTS y el 77.1% (91/118) de los pacientes Non-LTS recibieron tratamiento estándar (STUPP), siendo, por tanto, comparables en términos del tratamiento recibido (Tabla 24). La SG se analizó también mediante curvas de Kaplan-Meier en función del tratamiento recibido, esquema STUPP vs No-STUPP, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p=0.177$) (Figura 31, Tabla 24).

Tabla 24. Resumen de los datos de tratamiento recibido por los pacientes.

Tipo de tratamiento	Nº de pacientes
Stupp (Radioterapia + TMZ)	119
Sólo quimioterapia (TMZ)	6
Sólo radioterapia	6
No tratamiento*	5
Otros esquemas de tratamiento**	4

*Dos pacientes deterioro tras cirugía, 1 paciente rechaza tratamiento y 2 pacientes sólo observación.

**1 paciente RT con CIS platino, 2 pacientes RT con PVC y 1 paciente en ensayo clínico con Nivolumab.

6.5.2 Características moleculares de los tumores y su asociación con la supervivencia de los pacientes.

El 98.7% (155) de los 157 casos analizados, mostraron tener al menos una mutación puntual, INDEL o CNV detectada en alguno de los genes analizados (Figura 32). Los casos incluidos en el grupo LTS tuvieron una tasa de mutación media por caso de 2.4, frente a la del grupo Non-LTS que fue de 1.7, no siendo estadísticamente significativa esta diferencia.

El análisis de las frecuencias de alteración en los genes estudiados entre los grupos LTS y Non-LTS no mostró diferencias estadísticamente significativas, a excepción de las mutaciones en los genes IDH1 e IDH2, mutados en el 28.2% de los tumores de pacientes del grupo LTS y en el 0.8% de los del grupo Non-LTS ($p < 0.0001$) (Figura 33, Tabla 25).

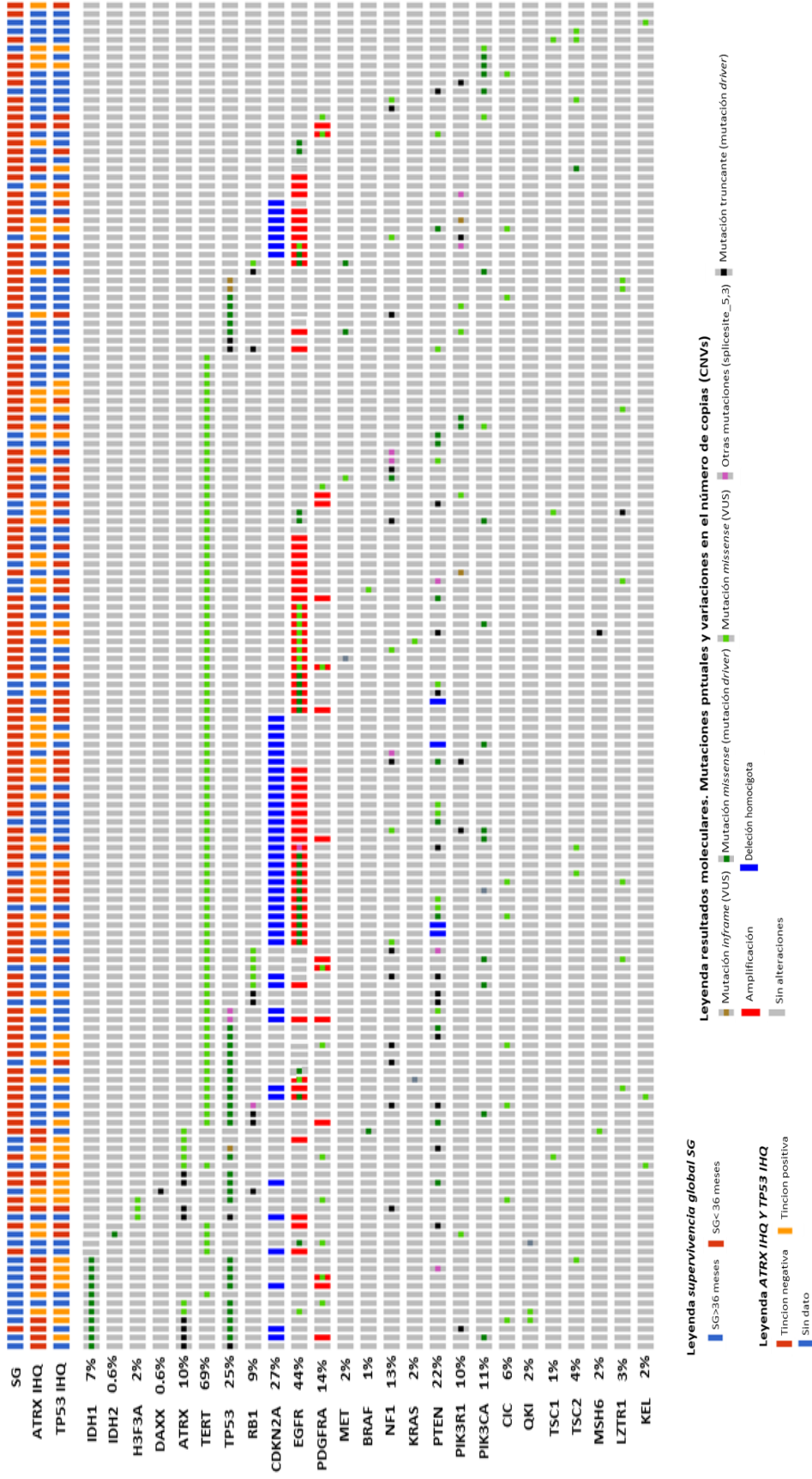


Figura 32. Resumen de las alteraciones moleculares detectadas mediante secuenciación del panel GLIO-NGS-30 e inmunohistoquímica (IHQ) en la serie estudiada (157 casos).

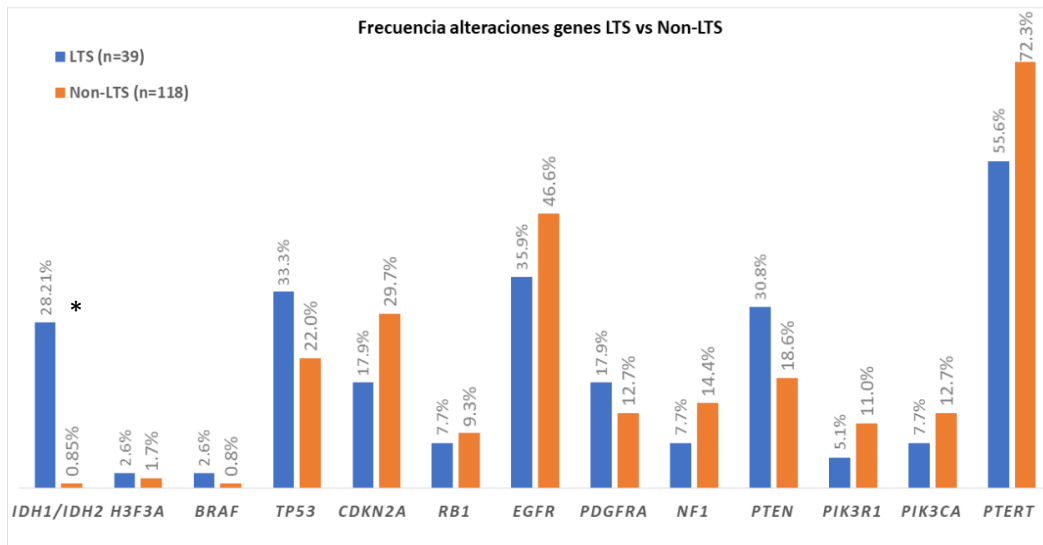


Figura 33. Frecuencia genes alterados en los grupos LTS y Non-LTS. *Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)

Cabe destacar la mayor frecuencia de tumores con alteraciones en el promotor del gen *TERT* dentro del grupo de pacientes Non-LTS (72.3%, 81/112) frente al grupo LTS (55.5%, 20/36), sin ser llegar a ser una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.067$). Sin embargo, cuando se consideraron aquellos pacientes con supervivencias extremadamente largas, de más de 60 meses, el 41.2% (7/17) de los pacientes presentaron mutaciones en el promotor de *TERT* frente al grupo de pacientes Non-LTS (55.5%, 20/36), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.022$) frente al grupo Non-LTS (Figura 33, Tabla 25).

Tabla 25. Resumen genes alterados en cada grupo de supervivencia LTS y Non-LTS

Gen alterado	LTS (n=39)		Non-LTS (n=118)		Total (n=157)	
	nº casos	Frecuencia %	nº casos	Frecuencia %	nº casos	Frecuencia %
<i>IDH1/IDH2</i> *	11	28.2	1	0.8	12	7.5
<i>ATRX/DAXX</i>	10	25.6	6	5.1	16	10.0
<i>H3F3A</i>	1	2.6	2	1.7	3	1.9
<i>TP53</i>	13	33.3	26	22.0	39	24.8
<i>CDKN2A</i> del homo	7	17.9	35	29.7	42	26.7
<i>RB1</i>	3	7.7	11	9.3	14	8.9
<i>EGFR</i>	14	35.9	55	46.6	69	43.9
<i>PDGFRA</i>	7	17.9	15	12.7	22	14.0
<i>NF1</i>	3	7.7	17	14.4	20	12.7
<i>BRAF</i>	1	2.6	1	0.8	2	1.2
<i>PTEN</i>	12	30.8	22	18.6	34	21.6
<i>PIK3R1</i>	2	5.1	13	11.0	15	9.55
<i>PIK3CA</i>	3	7.7	15	12.7	18	11.4
<i>pTERT</i>	20	55.5	81	72.3	101	66.9

*Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)

- **Alteraciones genéticas en los genes IDH1 e IDH2**

Los resultados obtenidos tras los análisis realizados mostraron que 12 de los pacientes incluidos en el estudio (7.5%) presentaron mutaciones en los genes *IDH1* e *IDH2*, siendo la edad media de los pacientes IDH mutados de 40 años (Figura 34). Estos pacientes en la clasificación actual de la OMS de 2021 corresponden a Astrocitomas IDH-mutados, grado 4.

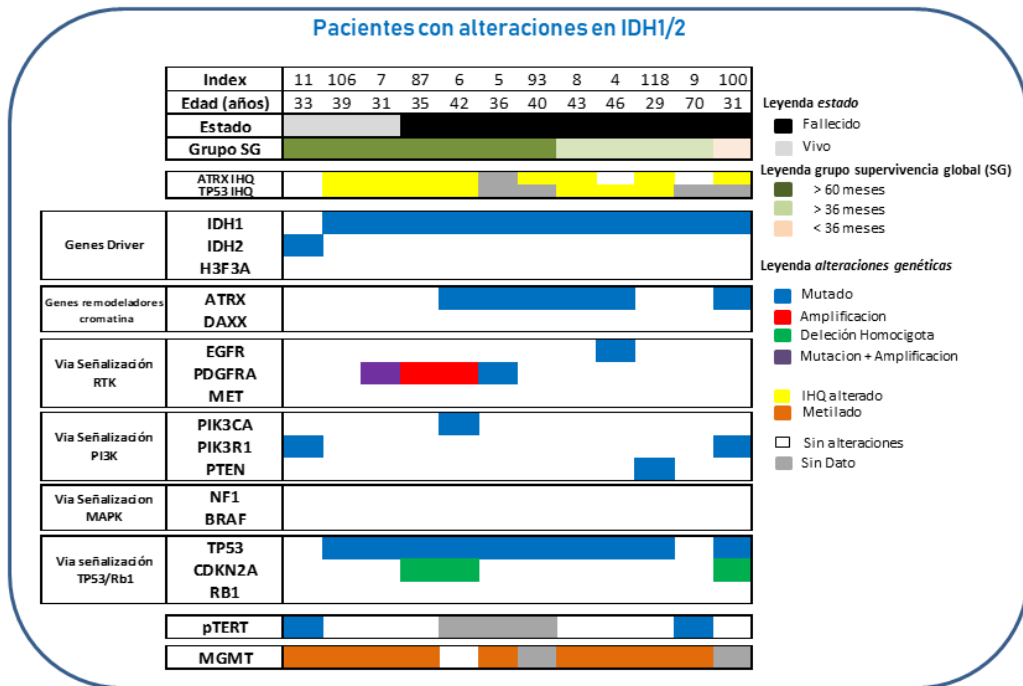


Figura 34. Resumen de las características clínicas y moleculares de los pacientes con alteraciones en los genes *IDH1* e *IDH2* dentro de la serie estudiada.

Estas mutaciones se detectaron en los puntos calientes de mutación (*hotspots*) de los genes *IDH1* (R132 en 11 casos: 10 LTS y 1 Non-LTS) e *IDH2* (R172 en 1 caso LTS). La mayoría de los tumores con mutación *hotspot* en los genes IDH (10/12) presentaron además alteraciones en TP53 y ATRX, detectadas mediante NGS o inmunohistoquímica. Sin embargo, los dos casos sin alteración en TP53 y ATRX presentaron una mutación en el promotor del gen *TERT* (Figura 34). En uno de estos dos casos en los que son concomitantes la mutación de IDH y la del promotor de *TERT* se descartó la presencia de la codelección 1p/19q, mientras que en el otro caso este estudio no pudo realizarse por falta de material, pero se mantuvo en la serie por presentar una morfología claramente astrocitaria en su totalidad, dada la ausencia de datos histológicos de oligodendroglioma.

Las curvas de supervivencia KM demostraron que aquellos pacientes con mutaciones en las regiones *hotspot* de los genes IDH presentaron mejores supervivencias que el resto, con una mediana de supervivencia de 50.0 meses (rango, 29.55-70.84) frente a 17.2 meses (rango, 19.75-19.58) en los IDH-no mutados ($p < 0.05$) (Figura 35).

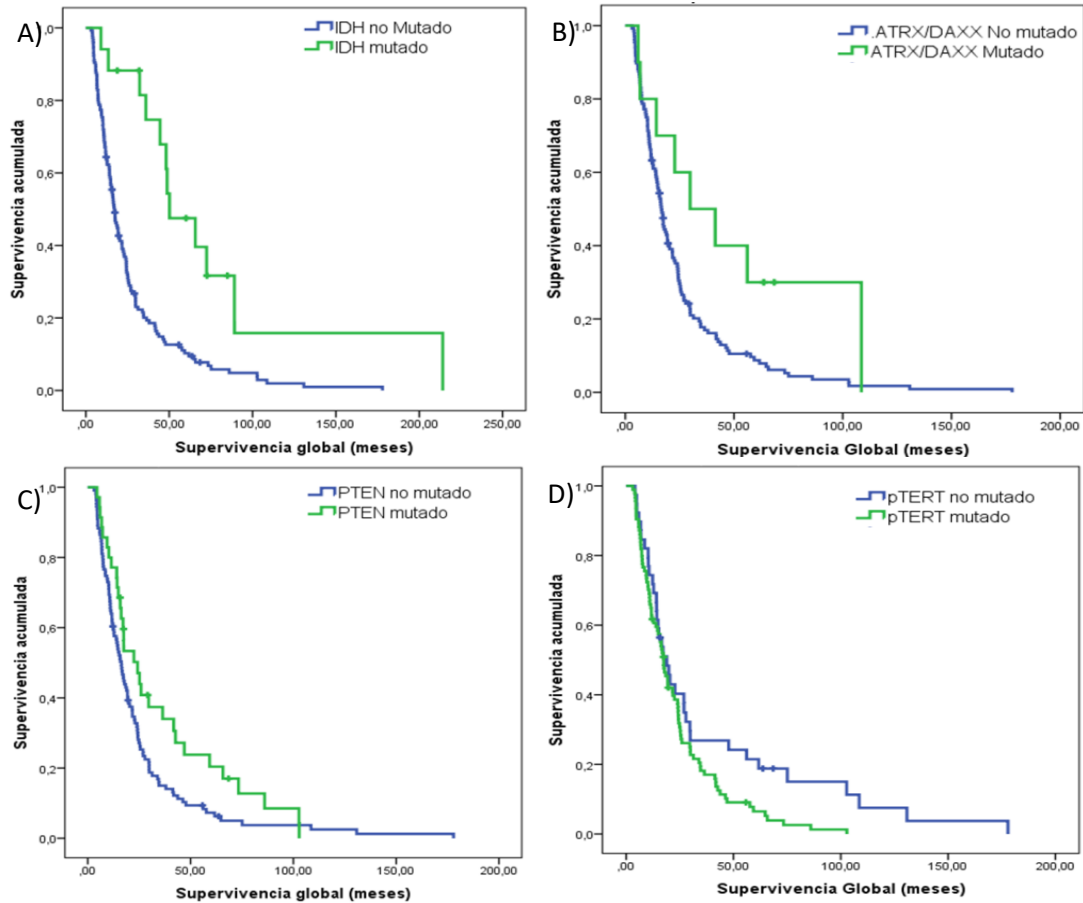


Figura 35. Curvas supervivencia global Kaplan-Meier en función del gen alterado. **(A)** Pacientes con mutaciones en localizaciones hotspot de IDH1 e IDH2 frente al resto de pacientes del estudio. Mutaciones en IDH se asocian a un mejor pronóstico log-rank $p=0.000$. **(B)** Pacientes con mutaciones en alguno de los genes remodeladores de cromatina (ATRX/DAXX) frente al resto. Mutaciones en ATRX/DAXX se asocian a mejor pronóstico, log-rank $p=0.039$. **(C)** Pacientes con mutaciones en el gen PTEN frente al resto. Mutaciones en PTEN se asocian a mejor pronóstico, log-rank $p=0.046$. **(D)** Pacientes con mutaciones en el promotor de TERT frente al resto. Mutaciones en pTERT se asocian a peor pronóstico, log-rank $P = 0.039$. **B), C), y D)** Análisis eliminando casos con mutaciones en genes driver (IDH, H3F3A y BRAF).

- **Alteraciones en el gen H3F3A**

Las mutaciones en los hotspots del gen H3F3A se detectaron en tres de los 157 pacientes (1.9%), todos menores de 35 años (edad media 31 años). En dos de ellos se detectó la mutación c.83A>T, p.(Lys27Met) (K27M), ambos dentro del grupo de Non-LTS, mientras que en el otro caso restante con supervivencia mayor a 36 meses se detectó la mutación c.103G>C, p.(Gly34Arg) (G34R). Estos casos corresponden en la nueva clasificación de 2021 a Glioma difuso de la línea media, H3 K27-alterado y Glioma difuso hemisférico, H3 G34-mutado, respectivamente.

- **Alteraciones génicas en el gen BRAF**

Se detectaron dos pacientes con mutaciones en el gen *BRAF*. Un paciente de 65 años incluido en el grupo LTS con la mutación c.1844G>A, p.(Gly625Glu) y otro paciente de 41 años incluido en el grupo Non-LTS con la mutación en la región *hotspot* del gen *BRAF*, c.1799T>A, p.(Val600Glu) (V600E). La histología de este último caso fue reevaluada sin encontrar ninguna característica de GB epiteloide, xantastrocitoma pleomorfo u otra característica que indicase un diagnóstico diferente al de GB.

- **Alteraciones en otros genes no drivers**

En este estudio comparativo, 140 casos (26 casos LTS y 114 Non-LTS) no presentaron ninguna alteración en los genes *driver* incluidos en el estudio (*IDH*, *BRAF* y *H3F3A*). La edad media de estos pacientes fue de 59 años (52 años en el grupo LTS y 61 años en el grupo Non-LTS).

Teniendo en cuenta los genes alterados con mayor frecuencia, dentro de estos 140 casos se observó una mayor frecuencia de alteraciones en *PTEN* en el grupo LTS (11/26, 42.1%) frente al grupo Non-LTS (22/114, 19.3%) ($p < 0.05$) (Figura 36).

Llama la atención los resultados de 7 pacientes con alteraciones en alguno de los genes implicados en la remodelación de la cromatina, *ATRX* y *DAXX*, sin alteraciones en otros genes *drivers* como *IDH1/2* o *H3F3A*. El 15.3% de los casos (4/26) estaba incluido en el grupo LTS, mientras que el 2.6% estaba incluido en el grupo Non-LTS (3/114), no llegando a ser estadísticamente significativa la diferencia entre ambos grupos ($p = 0.07$).

Con respecto al resto de genes, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas atendiendo a la frecuencia de alteraciones génicas entre los pacientes incluidos en los grupos LTS y Non-LTS.

De los 140 pacientes incluidos en este grupo, pudo analizarse el *status* de metilación del promotor de *MGMT* en 85 de ellos, estando metilado el promotor en un 40% de los casos. Dentro del grupo LTS, el 57% (12/21) presentaron metilación del promotor de *MGMT* frente al 34% (22/64) dentro del grupo Non-LTS, no siendo estadísticamente significativa esta diferencia ($p = 0.2633$).

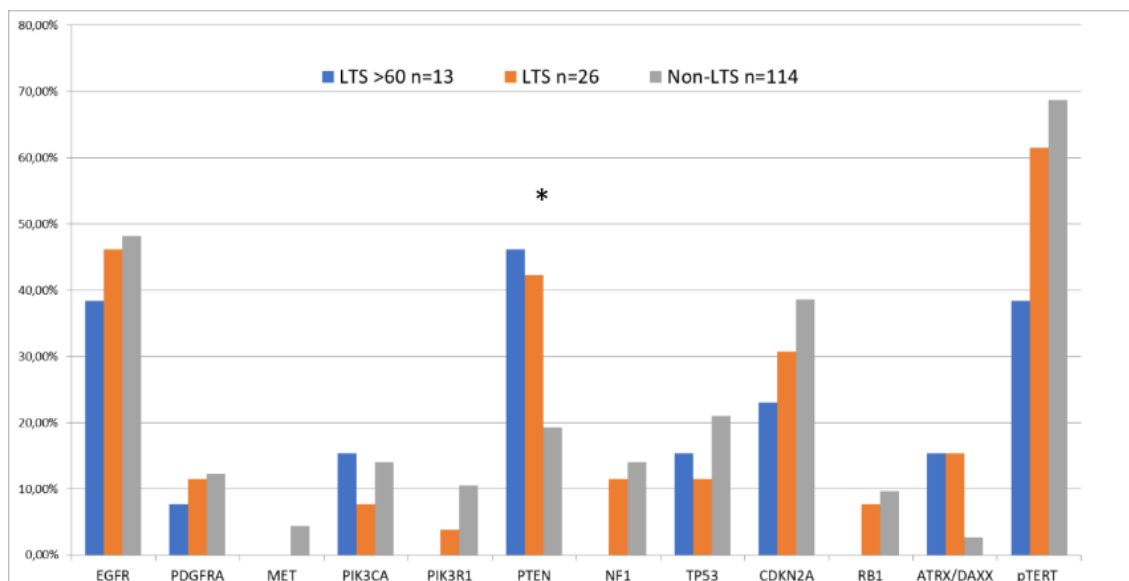


Figura 36. Comparación de la frecuencia alteraciones génicas entre LTS y Non-LTS excluyendo aquellos casos sin mutaciones en IDH, H3F3A y BRAF.

Con el fin de analizar toda la serie sin introducir sesgos de supervivencia producida por aquellos casos con IDH mutado, se analizaron a continuación las curvas de supervivencia KM de aquellos casos sin alteraciones *hotspot* en los genes *IDH1*, *IDH2*, *H3F3A* y *BRAF* (Tabla 26). Este grupo, con la nueva clasificación de 2021, correspondería a un grupo homogéneo de Glioblastomas IDH-no mutados.

Tabla 26. Datos de supervivencia global (SG) en función del gen alterado en Glioblastomas IDH-no mutados

	Mediana SG (meses) Alterado	Mediana SG (meses) No alterado
ATRX/DAXX*	29.8 (0.9-58.7)	16.6 (14.7-18.7)
PTEN*	24.2 (13.8-34.6)	16.4 (13.6-19.2)
EGFR	17.3	16.6
PDGFRA	14.9	17.3
CDKN2A	17.5	16.6
NF1	17.5	16.8
pTERT*	17.5 (14.6-20.4)	18.9 (12.8-24.9)
TP53	14.3	17.5
PIK3R1	15.7	17.2
PIK3CA	13.8	17.5
RB1	16.6	17.3
MGMT	24.2	21.6

*Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)

Los resultados mostraron que solo aquellos pacientes con alteraciones en los genes remodeladores de cromatina (*ATRX/DAXX*) sin alteraciones en otros genes *driver* y aquellos pacientes con alteraciones en el gen *PTEN* mostraron mejores supervivencias frente al resto, 29.8 meses (0.9-58.7) vs 16.6 meses (14.7-18.7) y 24.2 meses (13.8-34.6) vs 16.4 meses (13.6-19.2), respectivamente, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p=0.039$ y $p=0.046$, respectivamente) (Tabla 26 y Figura 36)

Por otro lado, aquellos pacientes con alteraciones en el promotor del gen *TERT* presentaron peores supervivencias globales frente al resto, 17.5 (14.6-20.4) meses frente a 18.9 meses (12.8-24.9), respectivamente (Tabla 26 y Figura 36) ($p<0.05$).

Finalmente, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la supervivencia global en función del gen alterado en el resto de los genes analizados en este estudio ni tampoco en función del estatus de metilación del promotor de *MGMT*.

6.5.3 Análisis LTS vs Non-LTS en la serie de GB TCGA PanCancer-Atlas.

Con el fin de validar los resultados obtenidos en la serie aquí estudiada, se obtuvieron los datos clínicos y moleculares de 536 pacientes con diagnóstico de GB disponibles en la base de datos PanCancerAtlas del TCGA. De estos casos, se obtuvo el dato de mutaciones y CNVs de los 30 genes incluidos en nuestro panel NGS-GLIO-30.

Atendiendo a los mismos criterios de selección de pacientes descritos en la sección de *Materiales y Métodos* para los análisis comparativos, los 394 casos seleccionados se agruparon en función de su supervivencia global. Entre estos casos, 41 pacientes tuvieron supervivencias mayores a 36 meses, agrupándose como TCGA-LTS y 353 pacientes tuvieron supervivencias globales menores a 36 meses, agrupándose como TCGA-Non-LTS.

Comparando los datos clínicos de nuestra serie frente a los recogidos de la serie del TCGA, tanto la mediana de supervivencia como la proporción de fallecidos/vivos dentro de los grupos LTS y Non-LTS son similares en ambas series (Tabla 27). Otros datos clínicos recogidos en nuestra serie como el sexo y la edad no se estaban disponibles en la base de datos del TCGA.

Tabla 27. Comparativa de datos clínicos entre la serie aquí estudiada y la del TCGA

	LTS	Non-LTS	TCGA LTS	TCGA Non-LTS
Hombre / Mujer	24 / 15	74 / 44	ND	ND
Mediana de edad (rango), años	51 (22-72)	62 (29-86)	ND	ND
Mediana SG (rango), meses	60.1 (36.0-214.0)	14.1 (3.1-34.5)	53.1 (46.9-72.4)	12.7 (12.1-14.0)
Fallecidos/Vivos	33 / 6	118 / 0	35 / 6	353 / 0
Nº Casos	39	118	41	353

Con respecto a las alteraciones moleculares en los 30 genes incluidos en el panel GLIO-NGS-30, se detectó un incremento en la frecuencia de casos LTS con alteraciones en los genes *IDH1*, *IDH2* y *ATRX* en el conjunto de casos de nuestra serie frente a los incluidos en la serie del TCGA (Tabla 28). Esta diferencia podría deberse al sesgo de selección de GB con largas supervivencias en nuestra serie.

En ambas series encontramos un incremento de casos con alteraciones de *CDKN2A* y *EGFR* en aquellos pacientes con menores supervivencias globales (Non-LTS), siendo estadísticamente significativa esta diferencia en la serie de TCGA y no en nuestra serie (Tabla 28 y Figura 36).

Tabla 28. Frecuencia de genes alterados entre la serie del TCGA en función del grupo de supervivencia.

GEN ALTERADO	TCGA	
	TCGA LTS (n=41)	TCGA Non-LTS (n=353)
IDH1/IDH2 (HOTSPOT)	8.0%	2.6%
H3F3A	2.5%	0.6%
ATRX/DAXX	10.0%	5.0%
SOLO ATRX/DAXX	2.4%	2.3%
TP53	38.0%	20.0%
CDKN2A HOMO DEL	57.0%	64.0%*
RB1	13.0%	9.0%
EGFR	35.0%	55.0%*
PDGFRA	20.0%	14.0%
NF1	8.0%	10.0%
BRAF	13.0%	2.6%
PTEN (MUTADOS)	29.2%	21.5%
PIK3R1	2.5%	7.0%
PIK3CA	2.5%	10.0%
CIC	0.0%	2.0%
QKI	2.5%	3.0%
LZTR1	8.0%	3.0%

*Diferencias estadísticamente significativas (p<0.05)

Con el fin de evaluar la asociación entre el gen alterado y la supervivencia global, se analizaron las curvas de Kaplan-Meier en los casos incluidos en la serie del TCGA. Los resultados mostraron que, al igual que en nuestra serie, aquellos pacientes con alteraciones en los genes *IDH1* e *IDH2* tienen mejor SG que los no alterados, 19.8 meses (rango, 14.0-25.6) frente a 13.9 meses (rango, 12.8-14.9), respectivamente, siendo significativa la diferencia ($p=0.05$).

Al igual que en el análisis realizado previamente en nuestra serie, con el fin de evitar sesgos en cuanto a la supervivencia de aquellos casos con alteraciones en genes driver como *IDH1*, *IDH2*, *H3F3A* y *BRAF* se analizaron las curvas de supervivencia de aquellos casos incluidos en el TCGA sin mutaciones en estos genes drivers (correspondiendo este grupo en la actual clasificación de la OMS 2021 con los GB *IDH* no mutados) (368 casos).

Aquellos pacientes de la serie TCGA con alteraciones en el gen *PIK3CA* presentaron peor supervivencia que aquellos pacientes que no tenían alteraciones en el gen, 12.2 meses (rango, 11.0-13.4) frente a 14.0 meses (rango, 12.8-15.2), siendo estadísticamente significativa esta diferencia ($p=0.021$) (Tabla 29). Cabe destacar que esta tendencia se observa de igual manera en nuestra serie, a pesar de que no fue significativa esta diferencia (13.8 meses vs 17.5 meses) ($p=0.41$) (Tabla 26).

Finalmente, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la mediana de SG asociada a la alteración del resto de genes analizados dentro de la serie de casos del TCGA seleccionados (Tabla 29).

Tabla 29. Mediana supervivencia global (meses) en función del gen dentro de la serie de casos del TCGA seleccionados.

	Mediana SG (me- ses) Mutado	Mediana SG (me- ses) No mutado	<i>p-value</i>
<i>ATRX/DAXX</i>	13.31	13.87	0.787
<i>CDKN2A</i>	13.87	13.64	0.235
<i>PTEN</i>	15.97	13.11	0.068
<i>PIK3R1</i>	11.37	13.97	0.073
<i>PDGFRA</i>	11.73	14.00	0.289
<i>EGFR</i>	14.72	12.59	0.850
<i>PIK3CA*</i>	12.23	14.00	0.021
<i>NF1</i>	12.46	13.97	0.805
<i>Rb1</i>	15.38	13.77	0.276

*Diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$)

6.6. ANÁLISIS DE GBs CON CÉLULAS GIGANTES

Ante el hallazgo de un grupo de 7 pacientes, con características moleculares inusuales (ya que presentaban mutaciones en los genes remodeladores de la cromatina *ATRX* o *DAXX* sin alteraciones moleculares concomitantes en otros genes drivers como *IDH1/2* o *H3F3A*) y mejores supervivencias globales, se realizó una nueva revisión de las características histopatológicas de estos 7 pacientes. Dicha revisión reveló la presencia de células gigantes multinucleadas en al menos un 20% de las células tumorales en 6 de estos 7 casos. Tras este resultado, se decidió realizar un estudio retrospectivo con el fin de estudiar mejor la posible asociación entre la mejor supervivencia de este grupo de pacientes y la presencia de estas características histológicas (células gigantes) y moleculares particulares (mutaciones en los genes *ATRX/DAXX* sin alteraciones moleculares concomitantes en otros genes como *IDH1/2* o *H3F3A*).

6.6.1 Características clínicas

Teniendo en cuenta los criterios descritos en la sección de *Materiales y Métodos*, se identificaron un total de 36 muestras de GB (7 muestras del estudio previo y 29 nuevos casos) provenientes de los hospitales, Hospital 12 de Octubre (Madrid) y Hospital Virgen de la Salud (Toledo). En 14 de estos pacientes el diagnóstico fue de GB de células gigantes, mientras que en 22 la presencia de células gigantes multinucleadas se describía solamente en el informe histopatológico, sin establecerse el diagnóstico final de GB de células gigantes.

La edad media de los pacientes incluidos fue de 50 años, con sólo 3 pacientes menores de 20 años. La proporción de hombres:mujeres fue de 2:1 (23 pacientes hombres y 13 mujeres). La localización tumoral más frecuente fue la temporal, en un 44% (16/36) de los casos, y la frontal en el 33% (12/36).

Los datos de evolución de los pacientes estaban disponibles en todos los casos a excepción de dos. Con estos datos, la mediana de supervivencia global fue de 15 meses (rango, 3-290 meses). También pudo obtenerse información acerca del tratamiento recibido en 27 de los 36 pacientes, habiendo recibido el tratamiento estándar (esquema STUPP) 24 pacientes, mientras que 3 de ellos recibieron sólo radioterapia.

6.6.2 Características histológicas e inmunohistoquímicas

La mitad de los pacientes incluidos presentaron más del 30% de células gigantes multinucleadas (50%, 18/36). El 60% de los casos (21/35) presentaron un diámetro medio de célula de más de 50 micras y el 75% de los casos una media de más de 5 núcleos (27/36). Dentro de los casos con más de un 30% de células gigantes, el 72% (13/18) mostraron tamaños de célula muy grandes (más de 50 micras) (Figura 37).

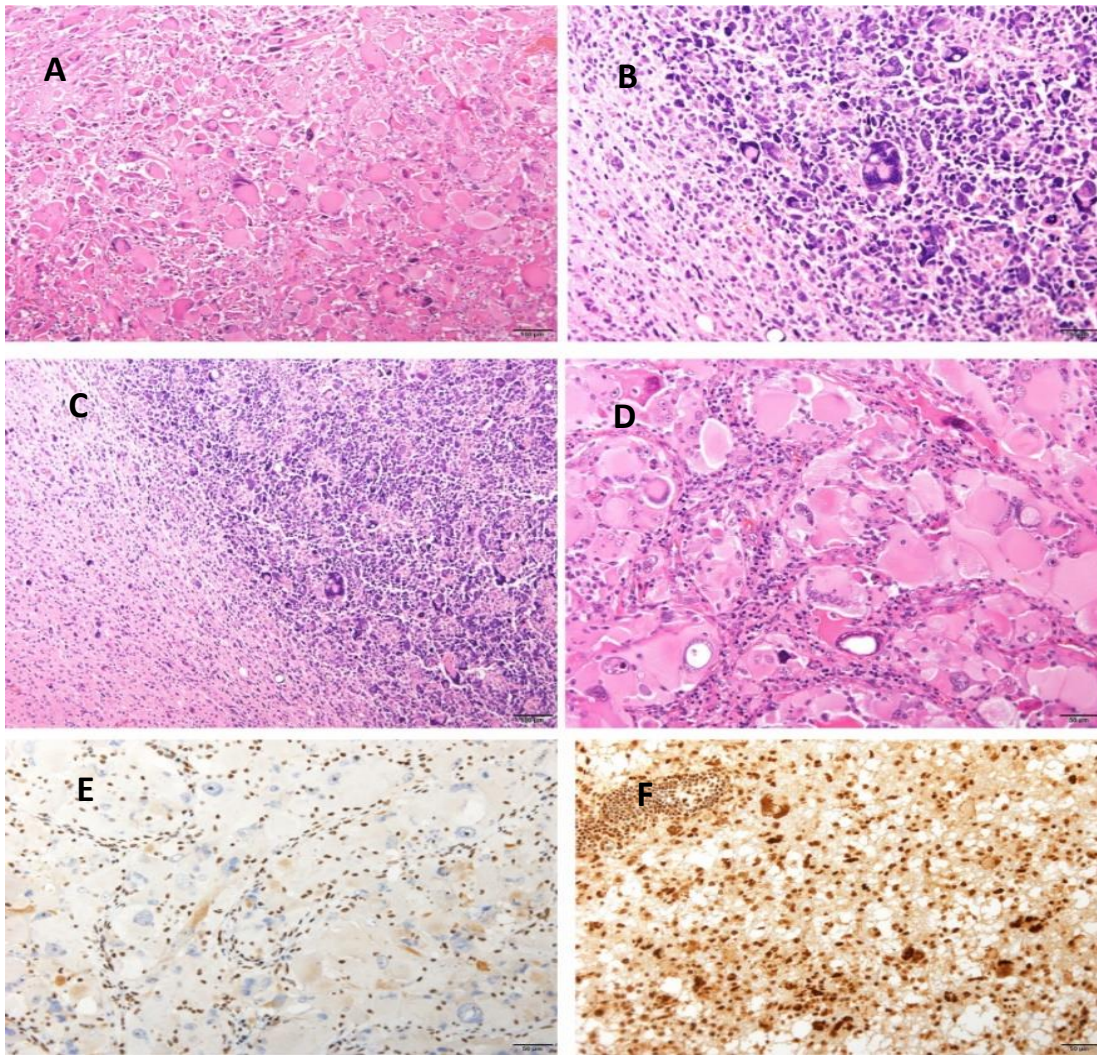


Figura 37. Imágenes de tejido tumoral de GBs con presencia de células gigantes. (A), (B), (C), (D): Tinción con hematoxilina-eosina de cuatro tumores diferentes que muestran células gigantes multinucleadas (barra de escala: abajo a la derecha). (E), (F): Tinción inmunohistoquímica de ATRX, mostrando tinción negativa nuclear de ATRX que indica pérdida de expresión de la proteína (E) y tinción positiva nuclear (F).

Con respecto al resto de parámetros histológicos revisados, no se observaron células gemistocíticas en ninguno de los casos, el 31% (11/36) presentó regiones con células epiteloideas, 2 casos presentaron regiones PNET-like, el 14% (5/36) presentaron nucleolos prominentes y el 31% (11/36) presentaron regiones infiltrantes linfocitarias (Figura 38). Finalmente, el 88% de los casos (31/35) presentaron necrosis y el 89% (28/35) proliferación vascular.

El estudio inmunohistoquímico reveló que el 89% de los casos (31/35) presentaron tinción inmunohistoquímica positiva para p53, así como el 26% (9/35) pérdida de tinción nuclear de ATRX. Sólo un caso presentó tinción positiva para IDH1 (R132H).

En 25 de los 36 casos (69%) se detectaron alteraciones en alguno de los genes implicados en el mantenimiento de los telómeros, *ATRX* ó *pTERT*. Un 30% de los casos (11/36) mostraron alteraciones en *ATRX*, variantes detectadas mediante NGS y/o pérdida de expresión detectada mediante estudio inmunohistoquímico. Del mismo modo, un 39% de los casos (14/36) presentaron mutaciones en el promotor del gen *TERT*, siendo excluyentes las alteraciones entre ambos genes.

De los 11 casos con alteraciones en *ATRX*, 9 presentaron pérdida de expresión de la proteína *ATRX* mediante inmunohistoquímica y los otros 2 restantes presentaron mutaciones del gen sin detectarse pérdida de expresión de la proteína en el estudio inmunohistoquímico. Con respecto a los 9 casos que presentaron pérdida de tinción de la proteína *ATRX*, se detectaron alteraciones génicas mediante estudio de NGS en 7 de estos 9 casos. Todos estos tumores con alteraciones en *ATRX* no presentaron mutaciones en otros genes concurrentes *driver*, como *IDH1*, *IDH2* o *H3F3A*. Por otra parte, atendiendo a las alteraciones en el gen *DAXX*, un gen implicado en la remodelación de la cromatina junto a *ATRX*, sólo 2 casos presentaron mutaciones en el gen.

Cabe destacar que el 73% (8/11) de los casos con alteraciones en *ATRX* mostraron más de un 30% de células gigantes multinucleadas, mientras que todos menos dos de los casos con alteraciones en el promotor del gen *TERT* presentaron menos de un 30% de células gigantes multinucleadas (4%, 2/14).

Siguiendo con el resto de los genes secuenciados con el panel GLIO-NGS-30, las alteraciones más frecuentes fueron detectadas en los genes *PTEN*, *EGFR*, *RB1* y *NF1*, detectándose éstas en un 29% (10/36), 25% (9/36), 30% (11/36) y 19% (7/36), respectivamente. Tres casos mostraron mutaciones en el gen *TSC2* y un caso en *TSC1*. Se revisaron los datos clínicos e histológicos de estos casos descartándose así el posible diagnóstico de astrocitoma subependimario de células gigantes.

No se detectaron alteraciones en los genes *H3F3A*, *CDKN2B*, *HIST1H3B*, *LZTR1*, *FOXR2* y *QKI* mediante el estudio de NGS. Un caso (E6) presentó dos mutaciones en *IDH1* en una posición diferente a la hotspot (R132), estas mutaciones (R49 y P147) se encuentran registradas en la base de datos COSMIC en muestras de tumores pancreáticos, estómago y melanoma.

Con respecto a la metilación del promotor del gen *MGMT*, el 46% de los casos (12/26) que pudieron ser analizados, presentaron metilación del promotor.

6.6.4 Análisis de la carga mutacional o Tumor Mutation Load (TML)

El análisis mediante NGS de la carga mutacional se realizó en 25 de los 36 casos incluidos en este estudio, siendo analizable para 22 de los 25 casos (3 casos mostraron una baja profundidad de lecturas, menos de 100x) (Figura 39).

La cobertura media para las 22 muestras analizadas fue de 706.8x, con una media de uniformidad del 93.9%. En 8 de las muestras analizadas se detectó una carga mutacional muy alta debido a un fenómeno de deaminación de las citosinas,

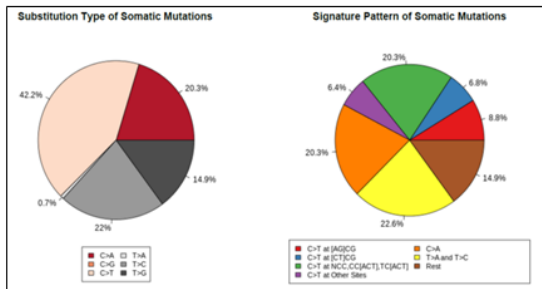
probablemente inducida por la fijación con formol de los tejidos durante el proceso de preparación del tejido para su análisis histológico (se observó un perfil mutacional muy aumentado en cambios C:G>T:A). Sobre estas 8 muestras se realizó un análisis y filtrado estricto de los resultados obtenidos con el fin de reducir estos artefactos.

El 82% de las muestras (19/23) mostraron niveles muy bajos de carga mutacional (TML), con una mediana de 4.2 mutaciones/Mb, dos tumores mostraron una carga mutacional extremadamente alta con valores de 199.6 y 78.9 mutaciones/Mb respectiva y finalmente dos casos mostraron valores intermedios de 14.6 y 8.3 mutaciones/Mb respectivamente.

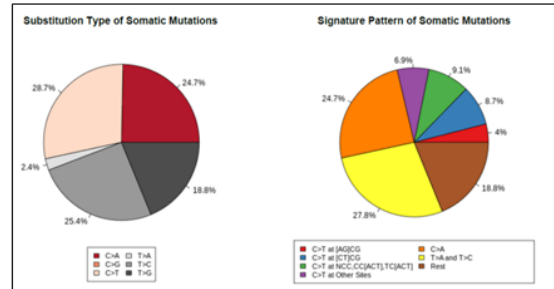
El análisis de los genes mutados en esos dos tumores con carga mutacional alta mostró dos patrones diferentes de mutaciones somáticas. El perfil de mutaciones somáticas del tumor con mayor carga mutacional (caso E6) tiene una mayor proporción de cambios nucleotídicos C>T, C>A, T>G y T>C y una baja proporción de cambios C>G y T>A, perfil mutacional similar a tumores con alteraciones en los genes reparadores del ADN como el gen *POLE* (Figura 40). Con el fin de confirmar o descartar esta hipótesis, se realizó la secuenciación del gen *POLE* mediante otro panel validado y usado en la rutina diagnóstica en el laboratorio del Hospital Erasme (Bruselas, Bélgica). Dichos análisis revelaron la presencia de la mutación P286R en el gen *POLE* con una frecuencia alélica del 44% en esta muestra. Por otro lado, el perfil de mutaciones somáticas del caso E7, tumor con mutación en el gen *IDH1* (R132H), se asemejó al identificado en melanomas (datos del Hospital Erasme no publicados) (Figura 40) y tras la revisión de aquellas mutaciones somáticas no sinónimas detectadas, se identificó la presencia de la mutación truncante Q681* (codon de parada) en el gen *MSH2*.

Sin embargo, aquellos casos con una carga mutacional intermedia presentaron perfiles de mutaciones somáticas del tumor semejantes a los descritos en tumores colorrectales (Figura 40) [85].

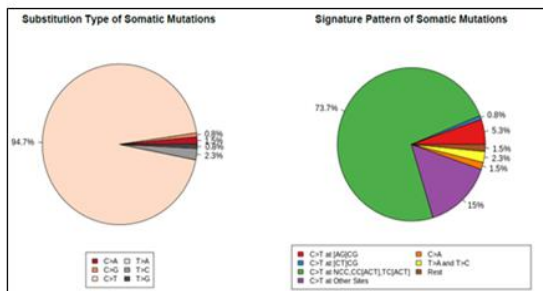
GBM células gigantes, POLE p.P286R (Caso 16)
TML = 199.6



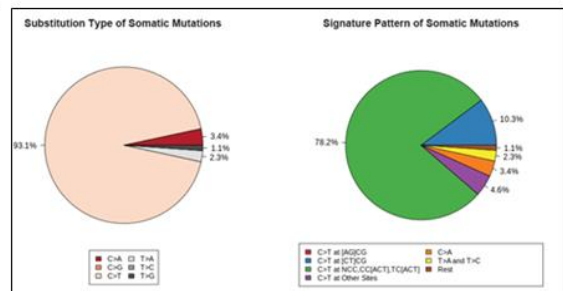
Tumor de endometrio POLE p.P286R
TML = 403.0



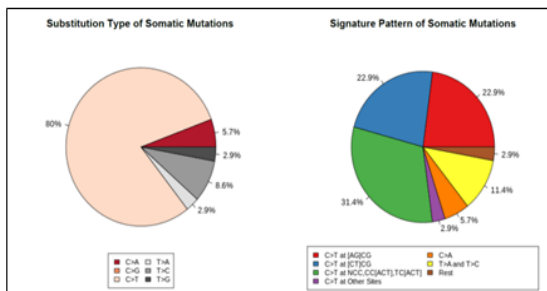
Caso 35, tumor con IDH1 mutado
TML = 78.9



Melanoma
TML = 41.9



GBM con > 30% de células gigantes (Caso 24)
TML = 14.6



Tumor colorectal, MSI-H
TML = 24.3

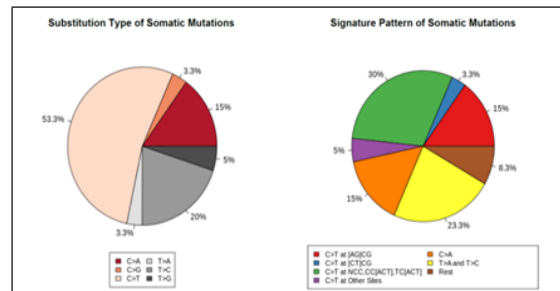


Figura 40. Perfil de mutaciones somáticas obtenido en los tres tumores con mayor carga mutacional. El perfil mutacional de los tumores se muestra a la izquierda y se compara con tumores con perfiles similares en la parte de la derecha.

6.6.5 Correlación clínica, histológica y molecular

En el estudio de esta serie, un 50% (18/36) de los casos presentaron más de un 30% de células gigantes en su histología. De éstos, todos presentaron alteraciones en *TP53*, la mitad presentaron alteraciones de *ATRX* (9/18) y sólo 2 casos presentaron mutaciones en el promotor de *TERT* (11%, 2/17). Por otra parte, sólo el 12% (2/18) de estos casos presentaron amplificaciones del gen *EGFR* y todos los casos menos uno, fueron IDHwt.

Por el contrario, de los 18 casos con menos de un 30% de células gigantes, el 67% (12/18) presentaron mutaciones en el promotor de *TERT*, el 28% (5/18) amplificaciones del gen *EGFR* y el 11% (2/18) alteraciones en *ATRX*.

Con respecto al resto de variables histológicas analizadas, no se encontró ninguna relación entre estas y las alteraciones moleculares estudiadas.

6.6.6 Estudio TCGA casos con GB-CG

Con el fin de validar los resultados obtenidos en la serie de tumores con células gigantes multinucleadas, se realizó una comparativa de los resultados obtenidos con respecto a los datos publicados en la base de datos TCGA.

Para ello, se seleccionaron todos los GBs del TCGA salvo los que tenían mutaciones en IDH. El total de casos seleccionados fue de 357 tumores clasificados como GB en general (que incluye todos los subtipos de GB). Del mismo modo para realizar esta comparativa no se consideró el caso E7 de nuestra serie, al presentar mutación en *IDH1* (R132H).

Comparando la frecuencia de alteraciones en los genes estudiados en aquellos GB IDH no mutado de la serie del TCGA, observamos que la frecuencia de mutaciones en los genes *TP53*, *ATRX*, *RB1* y *NF1* es significativamente mayor en el total de nuestra serie de GBs con células gigantes y en aquellos casos con más de un 30% de células gigantes con respecto a los casos seleccionados del TCGA. Atendiendo a la amplificación de *EGFR* y/o la delección de *CDKN2A* la frecuencia obtenida en nuestra serie fue significativamente menor con respecto a los casos del TCGA (Figura 41 y Tabla 30).

	Serie del TCGA (GB-IDHwt) % (n)	Nuestra serie % (n)	Serie estudiada, casos con > 30% células gigantes % (n)
TP53	27.4 (98)	85.7 (30)**	76.5 (13)**
RB1	10.6 (38)	28.6 (10)**	47.1 (8)**
ATRX	5 (18)	22.9 (8)**	35.3 (6)**
PTEN	35.3 (126)	28.6 (10)	29.4 (5)
NF1	12.9 (46)	17.1 (6)	29.4 (5)*
EGFR	26.1 (93)	22.9 (8)	11.8 (2)
PIK3R1	9.5 (34)	5.7 (2)	11.8 (2)
PIK3CA	9.2 (33)	5.7 (2)	5.9 (1)
CDKN2A del	58.5 (209)	5.7 (2)**	0.0 (0)**
EGFR ampl	50.4 (180)	20 (7)**	11.8 (2)**
Total (n)	357	35	17

Tabla 30. Comparativa de la frecuencia de genes alterados en los casos TCGA IDH no mutado (IDHwt) frente a los de nuestra serie. *Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) **Fisher test: $p < 0.0001$

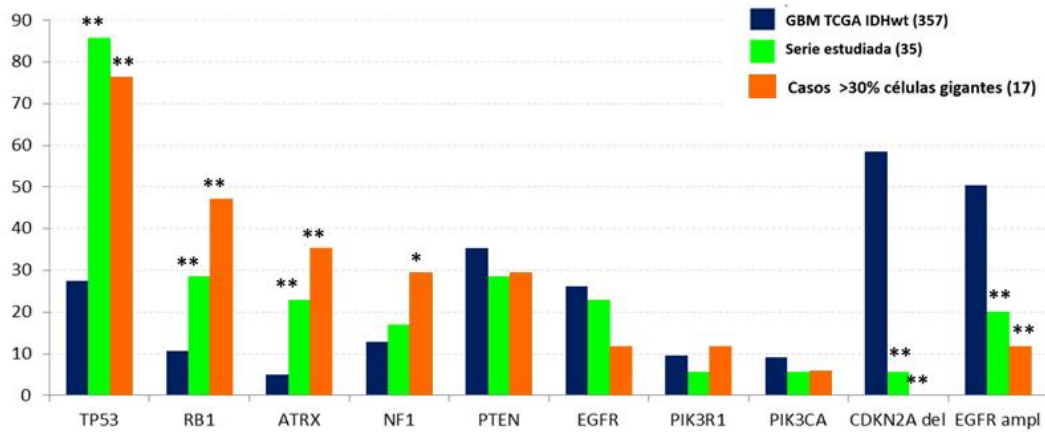


Figura 41. Gráfica comparativa de la frecuencia de alteraciones en los genes analizados en la serie estudiada frente a los casos del TCGA. *Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$); **Fisher test: $p < 0.0001$

Del mismo modo, se realizó una segunda comparativa seleccionando sólo aquellos casos con *TP53* mutado o delecionado dentro de la serie de casos del TCGA (103 casos), ya que, de acuerdo con nuestros resultados, todos GB seleccionados con células gigantes tenían alteraciones en *TP53*.

Se realizó además la revisión de las imágenes histológicas disponibles en la plataforma del TCGA de los casos con mutación de *TP53*, pudiéndose revisar los hallazgos histológicos en 76 de los 103 casos *TP53* mutados. Un 37% de estos tumores (28/76) se identificó la presencia de células gigantes, y en 21/76 (28%) casos el porcentaje de células gigantes fue mayor del 30% del total de las células tumorales (Figura 42).

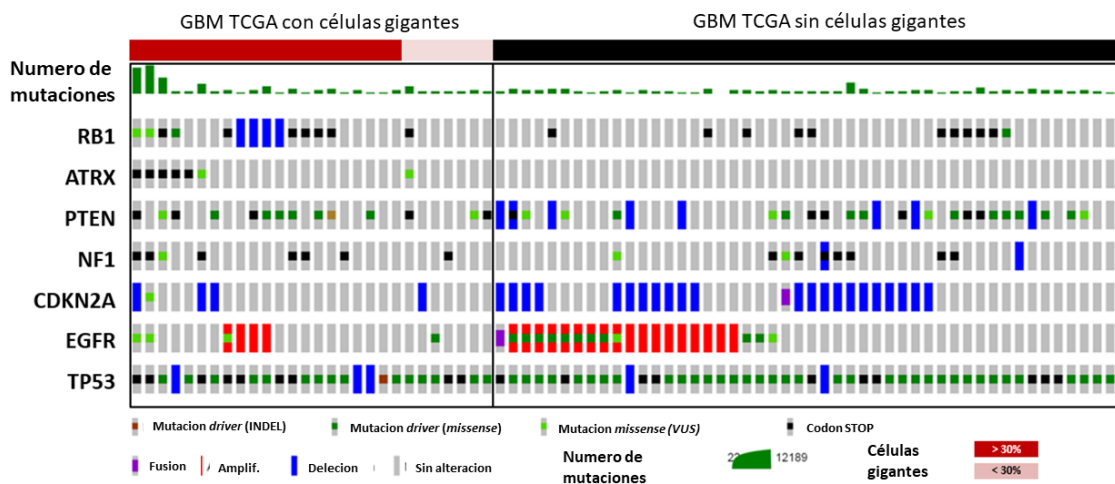


Figura 42. Resumen de alteraciones genéticas más relevantes de los 76 tumores del TCGA evaluados morfológicamente (*TP53* mutado e *IDH* no mutado). 21 casos mostraron más de un 30% de células gigantes (rojo oscuro), 7 menos de un 30% de células gigantes (rojo claro) y en 48 casos no se observaron células gigantes (negro)

Analizando las alteraciones genéticas de estos casos (Figura 42), se observa cómo aquellos casos con *TP53* alterado y células gigantes presentan mayores frecuencias de alteraciones en el gen *ATRX* que aquellos casos con *TP53* alterado sin células gigantes (25% vs 0%). Sin embargo, este último grupo presenta mayores frecuencias de alteraciones en *CDKN2A* y *EGFR* que el grupo de casos con *TP53* alterado y células gigantes (45.8% vs 14.3% y 37.5% vs 14.3% respectivamente), siendo estas diferencias estadísticamente significativas (Tabla 31 y Figura 43) y confirmando así los resultados obtenidos en nuestra serie.

Tabla 31. Comparativa de la frecuencia de genes alterados en los casos de la serie TCGA IDH no mutado y *TP53* alterado frente a la serie estudiada

	Serie TCGA <i>TP53</i> mut sin células gigantes % (n)	Serie TCGA <i>TP53</i> mut con células gigantes % (n)	Serie TCGA <i>TP53</i> mut >30% células gigantes % (n)	Serie estudiada % (n)	Serie estudiada > 30% GB-CG % (n)
<i>RB1</i>	22.9 (11)	35.7 (10)	61.9 (13)	28.6 (10)	47.1 (8)
<i>ATRX</i>	0.0 (0)	25.0 (7)**	28.6 (6)**	22.9 (8)**	35.3 (6)**
<i>PTEN</i>	43.8 (21)	50.0 (14)	52.4 (11)	28.6 (10)	29.4 (5)
<i>NF1</i>	18.8 (9)	28.6 (8)	33.3 (7)	17.1 (6)	29.4 (5)
<i>CDKN2A</i> del	45.8 (22)	14.3 (4)**	19.0 (4)*	5.7 (2)**	0.0 (0)**
<i>EGFR</i> ampl	37.5 (18)	14.3 (4)**	19.0 (4)	20.0 (7)**	11.8 (2)*
Total (n)	48	28	21	35	17

*Diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) **Fisher test: $p < 0.0001$

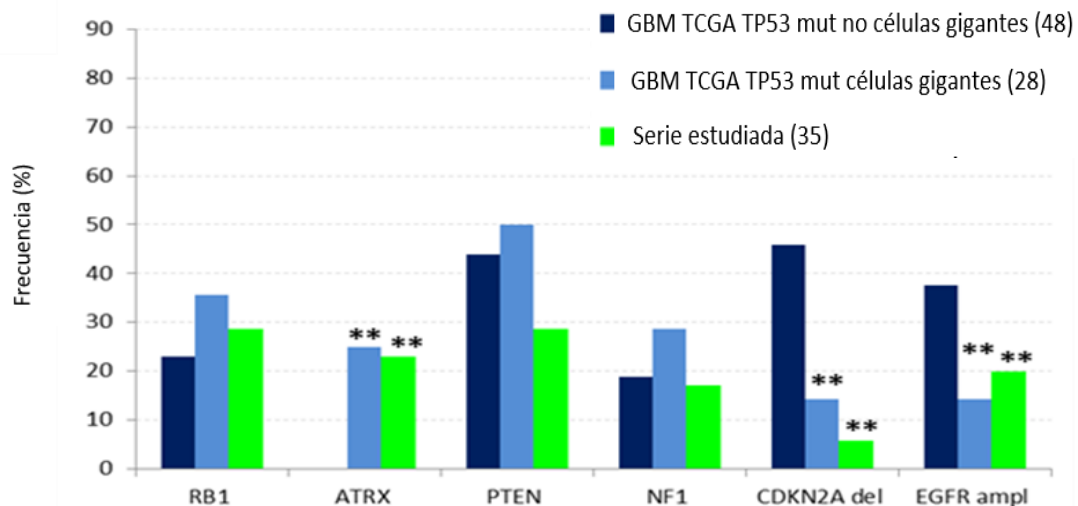


Figura 43. Comparativa de la frecuencia de alteraciones genéticas entre aquellos casos con *TP53* mutado sin células gigantes y aquellos con células gigantes dentro de la serie del TCGA frente a la serie estudiada. Fisher Test ** $P < 0.0001$, * $P < 0.05$.

En cuanto al resto de genes presentes en el panel analizados, se observa que las alteraciones en *RB1* son ligeramente más frecuentes en aquellos casos con células gigantes que aquellos sin células gigantes, sin llegar a ser significativa esta diferencia (Tabla 31 y Figura 43)

Analizando aquellos tumores del TCGA con *TP53* alterado, se observa que las diferencias en cuanto a la frecuencia de alteraciones en *ATRX*, *CDKN2A* y *EGFR* se ven incrementadas en aquellos tumores con más de un 30% de células gigantes frente a los que no presentan células gigantes. En los que tienen células gigantes, 6 de los 21 tumores (29%) tienen mutaciones en *ATRX*, 19% (4/21) amplificaciones de *EGFR* y 19% (4/21) deleciones de *CDKN2A* frente a 0%, 46% y 37%, respectivamente, en los que no las tienen (Tabla 31, Figura 43). Por tanto, estos resultados confirman nuevamente los resultados obtenidos en nuestra serie.

6.6.7 Análisis de supervivencia

Con el fin de evaluar la asociación entre la presencia de células gigantes con un porcentaje mayor del 30% y la supervivencia global, se realizaron las curvas de supervivencia global (Kaplan-Meier). Para este análisis se eliminó el caso con mutación en el gen *IDH1* (R132H) de nuestra serie.

Este análisis mostró que aquellos tumores con más de un 30% de células gigantes tenían mayores supervivencias frente a aquellos con menos de un 30% dentro de la serie de GBs estudiados en este apartado, con una mediana de supervivencia de 25.3 meses frente a 14.3 meses respectivamente (log rank test, $p=0.136$) (Figura 44A).

Se realizaron del mismo modo las curvas de supervivencia global (Kaplan-Meier) de los casos seleccionados del TCGA IDH no mutados, comparando aquellos con *TP53* alterado y aquellos sin *TP53* alterado. Se observa así diferencias significativas entre ambos grupos en cuanto a la supervivencia global, con una mediana de supervivencia de 13.8 meses frente a 13.3 meses el grupo de tumores con *TP53* no alterado y *TP53* alterado, respectivamente, siendo estadísticamente significativa esta diferencia (log rank test, $p=0.031$) (Figura 44B).

No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre aquellos pacientes analizados dentro de la serie del TCGA sin alteraciones en *TP53* al compararlos con aquellos con alteraciones en *TP53* y presencia de células gigantes en más de un 30% (log rank test, $p=0.124$) (Figura 44C). Sin embargo, se observa la tendencia de las curvas a una mejor supervivencia de aquellos casos con *TP53* alterado y células gigantes (mediana supervivencia 15.6 meses).

Tras observar dicha tendencia, con el fin de incrementar el número de casos con células gigantes, sumamos a nuestra serie de células gigantes los casos con células gigantes y *TP53* alterado del TCGA.

Las curvas de supervivencia muestran diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia global al comparar todos los tumores con más de un 30% de células gigantes (nuestra serie más casos del TCGA) frente a aquellos casos del TCGA sin alteraciones en TP53, mediana de supervivencia 21.3 meses frente a 18.3 meses respectivamente (log-rank test, $p=0.002$) (Figura 44D).

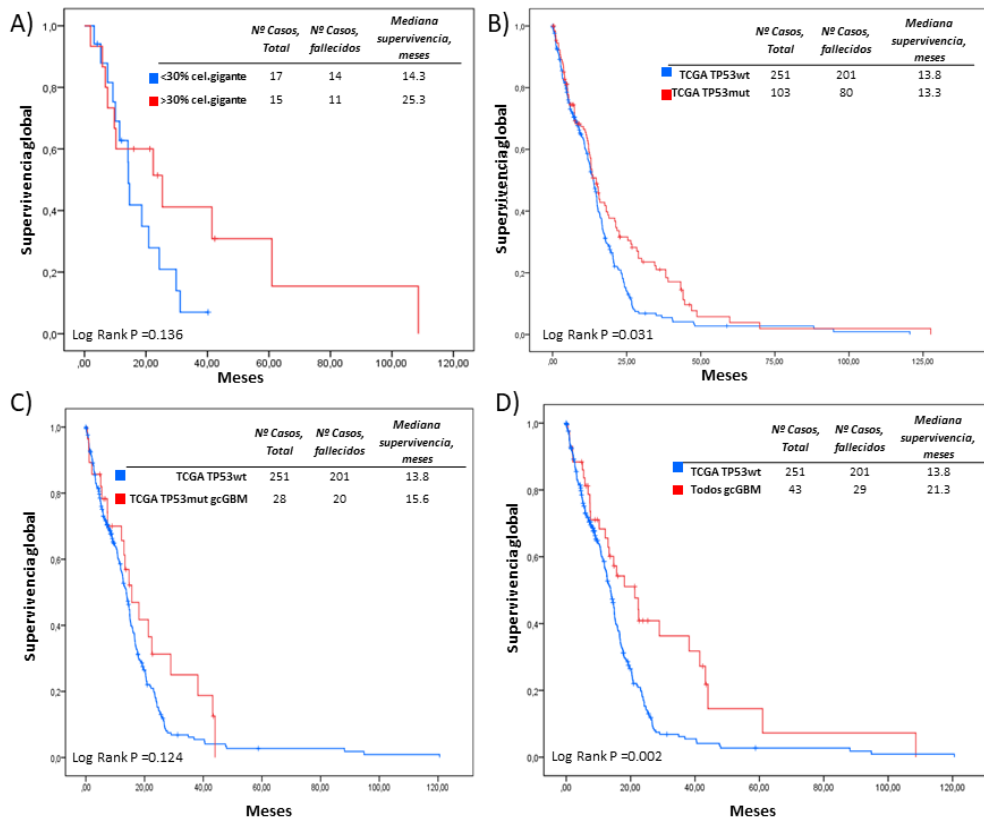


Figura 44. Análisis de supervivencia global (SG) (Kaplan-Meier) en tumores con células gigantes. A) Serie estudiada > 30% células gigantes vs <30% células gigantes. B) Serie TCGA TP53 mutado vs TP53 no mutado. C) Serie TCGA TP53 mutado sin células gigantes vs TP53 mutado con células gigantes. D) Serie TCGA TP53 no mutado vs Serie estudiada + Serie TCGA con células gigantes.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

7. DISCUSIÓN

7.1. DISEÑO Y VALIDACIÓN DE UN PANEL DE NGS PARA EL ESTUDIO Y DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LOS GLIOMAS

El gran avance que se ha producido en las últimas décadas, tanto en el desarrollo de las tecnologías de secuenciación masiva, como en el abaratamiento de los costes, ha permitido el estudio de genomas y exomas completos en numerosos tipos tumorales. Estos estudios han ampliado considerablemente el conocimiento que se tenía de las alteraciones genéticas y moleculares de muchos tipos de tumores, entre ellos el glioblastoma (GB).

Desde hace varias décadas, el GB se había caracterizado en base únicamente a sus características histopatológicas, estando vigente la anterior clasificación de los tumores del Sistema Nervioso Central de la OMS desde el año 2007 hasta su revisión en el año 2016. En dicha revisión ya se introdujeron algunos parámetros moleculares como características relevantes de algunas entidades. Sin embargo, es en la clasificación actual de 2021 [5], cuando se han introducido parámetros moleculares en la definición de ciertos tipos tumorales, siendo esenciales para el diagnóstico de estos tumores. El motivo de la inclusión de estos parámetros moleculares no es otro más que el de su utilidad clínica, en el sentido de que permiten mejorar la capacidad diagnóstica, pronóstica y/o de tratamiento, para el manejo clínico de los pacientes con estos tumores.

Cabe destacar que se han producido pocos avances en cuanto a la mejora de la supervivencia global de los pacientes con GB. Hasta la fecha, el tratamiento estándar sigue consistiendo en la resección máxima del tumor seguido de tratamiento basado en esquema STUPP propuesto en 2005, el cual se basa en radioterapia (RT) con temozolomida (TMZ) concomitante y adyuvante [11]. De esta manera, los avances en las técnicas clínicas, quirúrgicas y de tratamiento han conseguido alargar en unos meses la vida de estos pacientes, aunque siguen siendo tumores de mal pronóstico con una supervivencia media en torno a 15-18 meses [15].

Sin embargo, existe un pequeño porcentaje de pacientes que consiguen una supervivencia de más de 2 años, e incluso un pequeño porcentaje de los casos alcanzan supervivencias mayores a 5 años [3,4,16,17]. La/s causa/s de esta supervivencia más larga en algunos pacientes es/son todavía desconocida/s, y puede deberse a diversos factores, entre otros, factores moleculares.

Por lo tanto, existe la necesidad no satisfecha de emplear herramientas avanzadas y específicas para el diagnóstico molecular del GB en la rutina diagnóstica, y es por ello por lo que en nuestro grupo se propuso la realización de un panel dirigido de NGS que cubriese las principales alteraciones moleculares necesarias para poder

realizar un diagnóstico más preciso, predecir el pronóstico o incluso elegir el tratamiento de un paciente.

La finalidad principal en el diseño del panel GLIO-NGS-30 fue, por un lado, disponer de una herramienta de diagnóstico molecular avanzada que permitiese tener un diagnóstico completo del tumor, y, por otro lado, poder analizar aquellos genes más frecuentemente mutados en gliomas que, aunque no tuvieran implicación diagnóstica, pudieran tener relevancia en la supervivencia y por tanto, el pronóstico de estos pacientes con GB. En definitiva, tener una herramienta versátil, que nos permitiera en una rutina diagnóstica obtener la máxima información genética de los tumores.

Para el diseño del panel GLIO-NGS-30, la selección de genes se realizó tras una revisión bibliográfica de las principales publicaciones en las que se analizaban series grandes de gliomas y GB mediante técnicas avanzadas como NGS o *arrays* CGH, con el fin de poder elegir aquellos genes más frecuentemente alterados [22, 52, 53]. Cabe destacar que en el panel se incorporaron los genes más relevantes incluidos en la actualización de la clasificación de la OMS de 2016 para el diagnóstico de gliomas y cuyo análisis pasó a ser posteriormente necesario en el diagnóstico [5]. De esta manera, el diseño final obtenido nos permite analizar mediante NGS un rango de tumores que abarca desde gliomas de bajo grado a alto grado, así como gliomas pediátricos, teniendo así una herramienta versátil y útil para el diagnóstico de estos tumores en cualquier Servicio de Anatomía Patológica (Tabla 32).

Tabla 32. Genes incluidos en el panel GLIO-NGS-30 para el estudio en rutina diagnóstica de gliomas.

Estudio de SNV e INDEL						Estudio de CNV	
Glioma	Glioma (baja frecuencia)	Glioma pediátrico	Gliomas IDH-mutados	Oligodendroglioma	Otros (cáncer)	Amplificaciones	Deleciones
CDKN2A PTEN PIK3R1 PIK3CA PDGFRA RB1 MSH6 EGFR NF1	FOXR2 GLTSCR2 QKI KEL LZTR1	H3F3A HIST1HB DAXX	IDH1 IDH2 ATRX	FUB CICP1	BRAF KRAS TP53 TP73 MET TSC1 TSC2	PDGFRA EGFR	Chr1:1p Chr19:19q CDKN2A CDKN2B PTEN RB1 NF1

Con respecto a los genes incluidos para el estudio de mutaciones puntuales e INDELS, se incluyeron aquellos genes implicados en las 3 principales vías de señalización alteradas en el GB: la vía RTK/RAS/PI3K, la de RB y la de TP53 [53]. Dentro de los genes mutados con más frecuencia en estas vías se encuentran *CDKN2A/B*, *PTEN*, *PI3K*, *NF1*, *BRAF*, *PDGFRA*, *RB1* y *TP53*. Así mismo, se incorporó el estudio de

mutaciones en genes *driver* como *IDH1*, *IDH2* y *H3F3A* y *ATRX*, frecuentemente alterados en gliomas difusos de bajo grado y pediátricos [86]. También se incluyeron otros genes mutados con menos frecuencia en gliomas como, *FOXR2*, *GLTSCR2*, *QKI*, *KEL* y *LZTR1*. Finalmente, se incorporó al diseño el estudio de genes frecuentemente mutados en otros tipos de tumores dentro de las vías de señalización principalmente alteradas en gliomas, con el fin de abarcar otras alteraciones no tan frecuentes en gliomas, pero importantes en cáncer (*BRAF*, *KRAS*, *TP73*, *MET*, *TSC1*, *TSC2*), algunas como dianas terapéuticas. Dentro del análisis de CNVs, además de cubrir aquellas amplificaciones o deleciones frecuentes en gliomas difusos (*EGFR*, *PDGFRA*, *PTEN*, *NF1*, *CDKN2A*) se incorporó también en el análisis el estudio de las regiones genómicas 1p y 19q, con el fin de poder utilizar este mismo panel para el diagnóstico molecular del oligodendroglioma [87].

La tecnología elegida para el estudio mediante NGS del panel de genes NGS-GLIO-30 fue aquella basada en amplicones, ya que el tipo de muestra a analizar es un ADN procedente de muestras FFPE cuyas limitaciones son bien conocidas. El ADN de este tipo de muestras es dañado por el propio proceso de fijación de las muestras al emplear formaldehído, el cual se emplea como fijador de calidad superior para preservar muestras de tejido [88]. Sin embargo, éste crea enlaces entre proteínas y ADN [89], lo que disminuye el rendimiento en la extracción de ADN y, en ocasiones, la viabilidad del ADN para su amplificación por PCR. Del mismo modo, el formaldehído produce la fragmentación del ADN, de manera que el ADN extraído de muestras FFPE se encuentra en torno a 100-125pb [90]. Esto dificulta el empleo de tecnologías de NGS de captura por hibridación, ya que éstas requieren mayor cantidad de ADN que aquellas de amplicones. Además, uno de los factores más importantes para la eficiencia de la captura es el tamaño de fragmento, el cual se encuentra muy dañado en los ADNs procedentes de muestras FFPE [91].

La tecnología de secuenciación masiva, NGS, permite la detección de mutaciones puntuales (SNVs) y pequeñas deleciones y/o inserciones (INDELs). Sin embargo, la detección de alteraciones en el número de copias (CNVs) es un reto debido a problemas intrínsecos a la tecnología, como es el tamaño de lectura de fragmento [92]. Para el estudio de CNVs, las técnicas *gold estándar* son el MLPA (*Multiplex-Ligation Dependent Probe Amplification*) método basado en PCR multiplex; la tecnología de *131rrays* cGH (Hibridación Genómica Comparada) y la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) [93, 94]. Estas técnicas presentan varias limitaciones, como el tiempo empleado, la cantidad de material genético de partida, el coste y, en el caso del FISH y el MLPA, el número de genes a analizar. Esto hace que en la tecnología de NGS se busque la posibilidad de analizar también los CNVs de manera eficiente, para lo cual se están estudiando de forma activa diferentes algoritmos y recomendaciones para el análisis de CNVs a partir de los datos obtenidos mediante NGS [95, 96, 97].

Con el fin de comprobar la eficacia de la tecnología seleccionada, así como del correcto funcionamiento del panel diseñado, se procedió a su validación mediante

secuenciación de muestras no tumorales y de muestras con mutaciones ya conocidas mediante otras técnicas. En esta validación se demostró que en las muestras no tumorales no se detectaron mutaciones asociadas a tumores, mientras que, en las muestras con mutaciones ya conocidas mediante otras técnicas, todas las mutaciones fueron confirmadas mediante la utilización de nuestro panel de NGS GLIO-30. Estos resultados indican la alta especificidad y sensibilidad del método de detección mediante NGS. Por otro lado, al secuenciar 16 muestras mediante el panel GLIO-NGS-30, se obtuvieron resultados similares a los obtenidos previamente con otro panel de NGS comercial (Foundation One medicine CDx), confirmando la fiabilidad del panel diseñado. Por lo tanto, el panel diseñado para el estudio de 30 genes implicados en gliomas mediante tecnología de NGS basada en amplicones, GLIO-NGS-30, permite el estudio de tumores gliales como el glioblastoma con una rentabilidad alta, pudiendo detectar alteraciones en las principales vías de señalización alteradas en estos tumores.

Una de las principales limitaciones inherente a la tecnología de secuenciación masiva, como se ha comentado previamente, es la detección de CNVs. Para la validación del panel GLIO-NGS-30 en la detección de CNVs se utilizó un algoritmo manual, independiente al utilizado por el software *Ion Reporter* [78], software comercial asociado al secuenciador empleado (Ion Torrent). Para poder establecer el umbral del punto de corte del valor de *z-score* para el análisis de CNVs en genes como *CDKN2A*, *PDGFRA* y *EGFR*, se seleccionaron muestras cuyo resultado ya fuera conocido mediante otras técnicas (FISH o MLPA) y se analizaron con el panel GLIO-NGS-30, pudiendo establecer un punto de corte fiable para establecer la presencia de una amplificación o delección. Con respecto al resto de genes incluidos en el panel para los cuales era esperable poder analizar los CNVs (*NF1*, *PTEN*, *RB1*), no se obtuvo un punto de corte fiable debido, en parte, a que no se pudieron estandarizar los resultados por falta de controles con alteraciones en el número de copias en estos genes.

Cabe destacar la mayor sensibilidad del método desarrollado en este trabajo para el análisis de CNVs en comparación con el algoritmo empleado por el *software Ion Reporter*. Gracias al método desarrollado basado en el análisis de *z-score*, se han podido detectar:

- Amplificaciones en *EGFR* y *PDGFRA*
- Variantes estructurales de *EGFR* como las variantes VIII, vV y VII, producidas por la pérdida de varios exones en el gen.
- Deleciones homocigotas del gen *CDKN2A* con resultados concordantes respecto a otras técnicas consideradas *gold estándar* para el estudio de CNVs como FISH o MLPA.

Con el panel GLIO-NGS-30, combinando mutaciones y CNVs, un 96% de los casos estudiados presentaron al menos una variante en alguno de los genes analizados. Los genes alterados con mayor frecuencia en la serie de GB aquí estudiada fueron *EGFR*, *CDKN2A*, *TP53*, *PTEN*, *PDGFRA*, *PIK3CA* y *NF1*. De esta manera, los

resultados obtenidos con el panel GLIO-NGS-30 en nuestra serie han sido similares a los de series más amplias de GB, como la publicada en el TCGA, lo cual nos indica que los genes seleccionados para el estudio son representativos para la caracterización molecular del GB.

Con todo esto, se ha comprobado y validado el correcto diseño y funcionamiento del panel de genes NGS-GLIO-30, así como la tecnología seleccionada para el estudio de mutaciones puntuales, INDELS y CNVs (*EGFR*, *PDGFRA* y *CDKN2A*) en gliomas difusos.

Con respecto a la utilidad clínica del panel diseñado, cabe destacar la mayor rentabilidad del empleo de este tipo de tecnologías, permitiendo el análisis conjunto de varios genes, así como diferentes tipos de alteraciones genéticas en un solo estudio. La utilización del panel GLIO-NGS-30 reduce así el tiempo de respuesta en obtener un resultado molecular del tumor e incrementa la rentabilidad de la muestra empleada, dado que en ocasiones el tejido disponible es escaso, lo que limita la realización de diferentes técnicas básicas de biología molecular sobre una muestra. Todo ello realizándose mediante un método específico, fiable y sensible. Tras la publicación de la nueva clasificación de los tumores del sistema nervioso de la OMS en 2021, cabe mencionar que el diseño de este panel tendría que incluir el análisis de mutaciones en el promotor de *TERT* y las alteraciones en el número de copias del cromosoma 7 y 10, como mejora para el diagnóstico molecular de los gliomas difusos.

7.2. BIOMARCADORES PRONÓSTICOS

Hasta la fecha, algunas series han analizado las características clínicas asociadas a la larga supervivencia de pacientes con GB. Éstas incluyen la edad, índice de Karnofsky, localización del tumor, sintomatología al diagnóstico y extensión de la cirugía. Distintos estudios han demostrado que los pacientes con un mejor estado basal al inicio del diagnóstico, y/o resecciones lo más amplias posibles manteniendo las funciones cerebrales, se asocian con un mejor pronóstico [16, 98, 99, 100].

Al igual que en estudios anteriores, los resultados aquí obtenidos muestran que la edad es un factor pronóstico, ya que aquellos pacientes con edades menores a 60 años presentan supervivencias más largas, siendo la mediana de edad dentro del grupo de pacientes LTS de 51 años frente a 62 en el grupo Non-LTS [101]. Del mismo modo, aquellos pacientes con resecciones tumorales radicales (>95%) o subtotales (85-95%) presentaron mejores supervivencias frente a aquellos pacientes con resecciones parciales o biopsias, de forma similar a los resultados publicados por Lacroix *et al.*, que mostraron que aquellos pacientes con una resección radical del tumor (98% o más) presentaron mejores supervivencias [10].

Por último, con respecto a la sintomatología, en la serie estudiada, aquellos pacientes que debutaron con crisis epilépticas presentaron mejores supervivencias, acorde con los resultados presentados por Fan y colaboradores [102]. Esta mejora en cuanto a la supervivencia de estos pacientes podría deberse al diagnóstico precoz de la enfermedad, ya que ante una crisis epiléptica la valoración por un profesional

sanitario puede ser más precoz que ante otros síntomas de inicio como cefalea, alteración de la conducta u otros. Estudios como el de Flanigan y colaboradores demuestran cómo aquellos casos con GB en los que el tiempo entre la crisis epiléptica y la cirugía es menor, se observan mejores supervivencias globales frente a aquellos casos en los que el tiempo transcurrido es mayor, siendo esta diferencia de supervivencia del doble (26.8 vs 13.1 meses) [103].

Con relación a los factores moleculares, es bien conocida la asociación con un mejor pronóstico de los pacientes de las mutaciones de IDH, así como de la metilación del promotor de *MGMT* [82, 83, 104]. Sin embargo, hasta ahora no se ha realizado un estudio más exhaustivo con otros genes que podrían estar también implicados en la larga supervivencia de algunos pacientes con GB. El estudio de aquellos biomarcadores asociados a una mejor supervivencia dentro del GB es necesario para explicar aquellos factores implicados en el mejor pronóstico, ya que una proporción importante de estos pacientes no presentan ni mutación en IDH ni metilación en el promotor en el gen *MGMT* [82, 83].

En este estudio se ha empleado el panel diseñado NGS-GLIO-30 para el estudio de mutaciones y CNVs en aquellos genes mutados con mayor frecuencia en GB, con el fin de identificar aquellas alteraciones asociadas a larga supervivencia en pacientes con GB.

A nivel molecular, la mayor diferencia encontrada entre aquellos pacientes clasificados como LTS y No-LTS a nivel genético son las mutaciones en los genes IDH. En torno a un 28% de los pacientes incluidos en el grupo LTS presentaron mutaciones en *IDH1/2* con una mediana de supervivencia de 50 meses frente a 17.2 en aquellos sin mutaciones. Estos resultados concuerdan con los ya publicados en estudios anteriores [82, 83, 104]. Este hallazgo lo encontramos también en la serie ampliada de casos del TCGA que se ha analizado. Teniendo en cuenta aquellos casos incluidos en la base de datos del TCGA y los casos analizados en este estudio, encontramos que dentro de nuestra serie existe una mayor frecuencia de casos con mutaciones en *IDH1/2* y *ATRX* que en la serie de GBs del TCGA. Esto probablemente es debido al sesgo de selección de casos con larga supervivencia dentro de nuestra serie (32% vs 12% casos con *IDH1/2* y 31% vs 15 casos con *ATRX* respectivamente en ambas series). Bleekerv y colaboradores evidenciaron por primera vez en 2010 el incremento en la supervivencia global de pacientes con GB IDH mutado como factor independiente de la edad, KPS, resección quirúrgica, dosis de radioterapia recibida o quimioterapia [105]. Desde entonces, son numerosos los estudios que apoyan la mejor supervivencia global de aquellos GB con mutaciones en IDH frente a GB sin mutaciones en IDH [106, 107, 108].

La enzima isocitrato deshidrogenasa (IDH) participa en diferentes procesos metabólicos, como puede ser el ciclo de Krebs, el metabolismo de glutamina, la síntesis de lípidos y los procesos de regulación redox [109, 110, 111]. Las mutaciones en *IDH1* producen un incremento en la actividad catalítica de la enzima, por lo que toda esta desregulación metabólica ocurrida en la célula tiene como consecuencia directa, entre otras, el incremento de NADP⁺ y la disminución de NADPH. NADPH es el mayor metabolito que protege a la célula de especies reactivas de oxígeno (ROS). De esta manera, los tumores con mutaciones en IDH son más susceptibles de estrés

inducido por ROS como el producido por radiación o tratamiento con temozolomida [113] (Figura 45). Esta parece ser la explicación a la mejor respuesta a tratamiento de aquellos pacientes con IDH mutado y por ello una mejor supervivencia de manera independiente de otros factores.

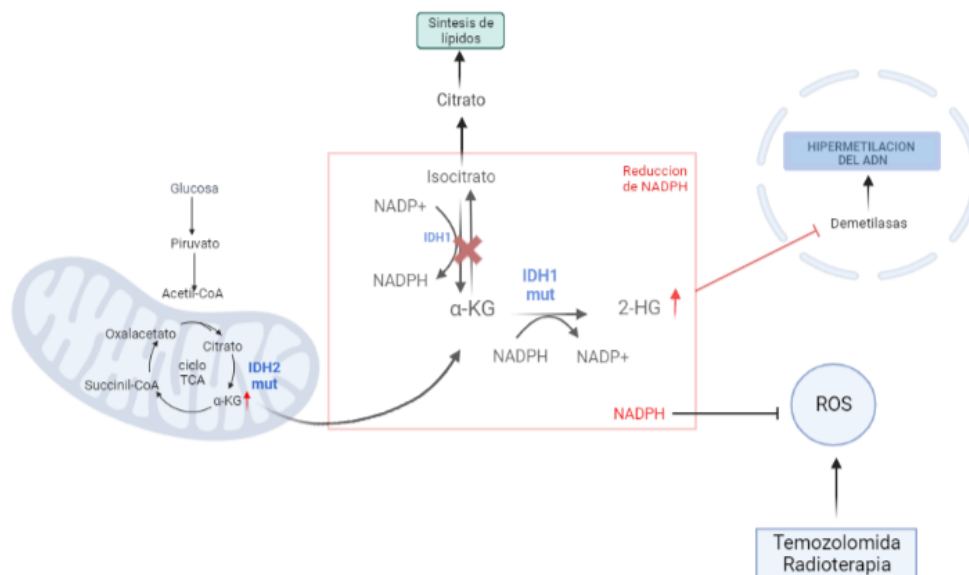


Figura 45. Resumen de las reacciones bioquímicas para la producción de energía y lípidos en la célula en las que interviene IDH. La IDH1 mutado cambia la dinámica de los procesos metabólicos en la célula y conduce a la acumulación de 2-hidroxiglutarato (2HG). A su vez, la 2HG inhibe las demetilasas (HDM y TET), lo que conduce a un fenotipo hipermetilado del ADN. Figura adaptada de Maus & Peters [108].

Es bien conocido el papel de IDH mutado como precursor oncogénico y la asociación de estas alteraciones con el mejor pronóstico en gliomas, de modo que en los últimos años IDH ha sido objeto de estudio en diferentes ensayos de nuevos fármacos dirigidos a este *target*, bien sea mediante inhibidores directos o tratamientos inmunoterápicos [50]. Muy recientemente, han sido publicados resultados muy prometedores en cuanto al tratamiento de gliomas difusos de bajo grado con mutación en IDH con el fármaco Vorasidenib (inhibidor *IDH1/2*). Los resultados de este estudio demuestran cómo este fármaco incrementa la supervivencia libre de progresión en 30 meses y la reducción del tamaño tumoral, abriendo así las puertas a estudios sobre el uso de este fármaco en gliomas de mayor grado con alteraciones en IDH [51].

Con todo esto, los resultados que hemos obtenido, y los ya publicados por otros autores, mantienen la importancia de las alteraciones en *IDH1/2* como factor pronóstico de supervivencia en GB, aunque una fracción de pacientes no tenga alteraciones *IDH1* ni en *IDH2* y aun así sobrevivan más de 36 meses. En este estudio, 28 de los 39 casos incluidos en el grupo LTS no presentaron mutaciones en *IDH1/2* (72%), suponiendo esto un 17.8% del total de la serie, por lo que pueden existir otras alteraciones moleculares distintas a la de IDH que podrían explicar la larga supervivencia en algunos pacientes.

Las tres vías de señalización alteradas con mayor frecuencia en GB son: RTK/PI3K, TP53 y RB, que se encuentran alteradas en más de un 70% de GB [52, 53]. Con el fin de analizar los genes implicados en estas vías, sin introducir sesgos por alteraciones en otros genes *driver* como *IDH1/2*, *BRAF* y *H3F3A*, se analizaron aquellos casos sin alteraciones en estos genes (140 pacientes, de los cuales 26 corresponden a LTS y 114 a Non-LTS).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre LTS y Non-LTS dentro de los genes implicados en la vía TP53 ni RB. Sin embargo, con respecto al análisis de genes alterados en la vía de señalización RTK/PI3K (Figura 11), se detectó una mayor frecuencia de casos con alteraciones en *PTEN* en el grupo LTS frente al grupo Non-LTS (42.1% vs 19.3%, respectivamente; $p < 0.05$) y diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia global entre aquellos casos con mutaciones en *PTEN* respecto a los que no presentaban mutaciones 24.2 vs 16.4 meses ($p < 0.05$). Resultados similares se obtuvieron cuando se comparó la frecuencia de casos con mutaciones en *PTEN* dentro de los grupos LTS y Non-LTS al analizar la serie del TCGA (29.2% vs. 21%, respectivamente), aunque en dicha serie no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la SG entre aquellos casos con mutaciones en *PTEN* y sin mutaciones (16 vs 13 meses $p = 0.07$).

Una de las alteraciones cromosómicas más frecuentes en GB es la pérdida de heterocigosidad (LOH) del brazo largo del cromosoma 10 (10q), el brazo cromosómico en el que se localiza *PTEN* (10q23). Las alteraciones en el gen *PTEN* se encuentran en aproximadamente un 50% de los GB [118], siendo uno de los genes supresores de tumores más importantes implicados en cáncer y en GB. Diversos estudios han demostrado que la LOH en 10q, y en concreto la región de *PTEN*, se asocia a un peor pronóstico de los pacientes con gliomas de alto grado [114, 115, 116, 117]. Sin embargo, *PTEN* puede estar alterado también por otros mecanismos, como pueden ser mutaciones puntuales, deleciones o metilación. Aquellos casos con mutaciones de *PTEN* presentan de manera concomitante pérdidas de heterocigosidad (LOH) en la región 10q, por lo que de esta manera la inactivación del gen ocurre mediante dos eventos [114, 115]. Los resultados de Kraus y colaboradores, y de Zhou y colaboradores [118, 119] indicaron que no existe ninguna asociación estadísticamente significativa entre mutaciones de *PTEN* y supervivencia en pacientes con GB (tratados con esquemas de tratamiento anteriores al establecido en STUUP).

Una limitación en el análisis de alteraciones en *PTEN* dentro del estudio presentado aquí es que no se han podido analizar las deleciones del gen mediante el panel de NGS. Por otro lado, tampoco la región 10q se encuentra incluida dentro del diseño del panel. Tras la nueva clasificación de la OMS de 2021, que recomienda el estudio de la alteración de ganancia del cromosoma 7 junto con pérdida del cromosoma 10 (+7/-10), sería importante la incorporación del análisis de este cromosoma completo con el fin de completar los marcadores moleculares para el diagnóstico de estos tumores.

Cabe destacar, que dentro de los casos incluidos en la base de datos del TCGA, al igual que en la serie estudiada, se observa una mayor frecuencia de casos con alteraciones en el gen *PIK3CA* dentro del grupo Non-LTS frente al grupo LTS.

Atendiendo a la supervivencia global de aquellos casos con mutaciones en *PIK3CA* dentro de la serie del TCGA, aquellos casos con mutaciones en *PIK3CA* presentan peores supervivencias que aquellos casos sin alteraciones en este gen (mediana de supervivencia 12.2 en grupo Non-LTS frente a 14.0 en grupo LTS; $p=0.021$). Esta diferencia en cuanto a la supervivencia se observa también en los resultados obtenidos en la serie aquí analizada (14 y 18 meses en LTS y Non-LTS, respectivamente), sin llegar a ser estadísticamente significativa, seguramente debido al número de casos incluidos.

Los estudios publicados por Tanaka *et al.* y Cheila Bito *et al.* [121, 122] concuerdan con los resultados obtenidos en este estudio. En ambos, demuestran cómo las mutaciones en *PIK3CA* se asocian a peor pronóstico en aquellos pacientes con GB sin mutaciones en IDH independientemente de otras variables. Por lo tanto, aunque se requieren estudios adicionales con una muestra de pacientes LTS mayor (cabe destacar que la frecuencia de mutación de este gen en el GB está en torno al 10%), estos datos sugieren que mutaciones en *PIK3CA* en pacientes con GB podría asociarse a peor supervivencia.

El gen *PIK3CA* codifica para la subunidad catalítica de la proteína fosfatidilinositol-4,5- bifosfatasa y ha sido descrito como uno de los genes más frecuentemente mutados en cáncer [123,124]. La activación de esta vía se produce mediante mutaciones en el gen *PIK3CA* y ha sido descrito en aproximadamente el 30-50% de los cánceres, asociándose a resistencia de diferentes terapias empleadas y con el peor pronóstico de los pacientes [125, 126]. Se han descrito alteraciones en *PIK3CA* en tumores como el cáncer de mama (35%), endometrio (36%), vejiga (>18%) y colon (18-38%) [123, 127, 128]. En el GB se han descrito frecuencias de entre el 5-30% de casos, aunque dichas frecuencias no quedan bien definidas [53, 129, 130, 131].

Dentro de las mutaciones detectadas en la serie aquí estudiada, detectamos mutaciones en regiones *hotspot* descritas en otros tipos de tumores, exones 9 y 20, en concreto en las posiciones E542, E545 y H1047 [132, 133,134,135], así como en otras localizaciones (Figura 46).



Figura 46. Mutaciones y frecuencia de las mutaciones en el gen PIK3CA. A) Mutaciones detectadas en todos los tumores sólidos registrados en la base de datos COSMIC (1459 tumores), B) En la serie de GB estudiados (157 GB) y C) En la serie del TCGA, GB sin mutaciones en genes driver (27 GB). No se han incluido aquellos casos con amplificaciones en PIK3CA, ya que dentro de nuestra serie estudiada no se ha podido analizar la amplificación de este gen. Debajo de cada grafica se indica si la mutación se encuentra registrada en OncoKb [136]. El tipo de mutación, así como su patogenicidad se encuentran indicadas con diferentes colores según la leyenda indicada en la parte inferior de la figura.

En los últimos años, son numerosos los ensayos clínicos desarrollados con inhibidores de PI3K o específicos de la subunidad PIK3CA [136, 137, 138], aunque pocos están aprobados por la FDA debido a sus efectos secundarios, así como por su poca solubilidad y permeabilidad. Sin embargo, se ha observado que el tratamiento con inhibidores de PI3K en combinación con tratamientos dirigidos a otras vías como inhibidores tirosin kinasa, inhibidores de MEK, inhibidores PARP o tratamientos con anti-estrogenos, incrementan la eficacia de los inhibidores de PI3K. Un ejemplo de ello es el tratamiento con alpelisib (inhibidor kinasa) en combinación con fulvestrant (antagonista receptor de estrógenos), aprobado por la FDA en cáncer de mama avanzado [139].

En gliomas de alto grado se están desarrollando ensayos clínicos en fase I de inhibidores PI3K como voxalisib (inhibidor de kinasa (PI3K) y vía mTOR), en combinación con temozolamida y radioterapia, para analizar la permeabilidad del fármaco, la tolerancia de diferentes dosis y el efecto antitumoral en pacientes con GB, aunque sin grandes resultados hasta la fecha. Se requieren, sin embargo, más estudios con inhibidores PI3K en combinación con otras terapias en series con mayor número de casos con mutaciones en alguno de los genes implicados en la vía PI3K (PI3KCA, PIK3R1, KRAS, PTEN, EGFR o KIT). Hasta el momento, son muy pocos los biomarcadores que actúan como dianas para el tratamiento de los pacientes con GB,

habiendo una necesidad urgente de nuevas terapias dirigidas a otros biomarcadores como pudiera ser el caso de PIK3CA [140].

Marcadores moleculares tales como la amplificación de *EGFR*, mutaciones en el promotor de *TERT*, deleciones de *CDKN2A/B* y alteraciones genómicas como la ganancia del cromosoma 7 y pérdida del cromosoma 10 (+7/-10) cobran importancia en la nueva clasificación de los tumores del sistema nervioso central [15]. A nivel molecular, en esta nueva clasificación, aquellos astrocitomas difusos sin mutaciones de IDH que presenten amplificación de *EGFR*, mutaciones en el promotor de *TERT* o +7/-10, son clasificados como tumores de grado 4 (GB IDH-no mutado). Por otro lado, astrocitomas con mutación de IDH que presentan deleción en homocigosis de *CDKN2A/B* son clasificados de igual manera con grado 4 independientemente de las características histológicas del tumor, es decir incluso en ausencia de proliferación vascular o necrosis.

En el caso del grupo de pacientes sin alteraciones en IDH u otro gen *driver*, en la serie analizada se detectó una mayor frecuencia de pacientes con deleciones en *CDKN2A* y alteraciones en *EGFR* en aquellos casos clasificados como Non-LTS frente a aquellos pacientes clasificados como LTS (38.6% frente a 30.7% en el caso de *CDKN2A* y 48.2% frente a 46.15% en el caso de *EGFR*), no siendo estadísticamente significativa la diferencia. Esto podría ser debido al tamaño de la muestra analizada, ya que dentro de los casos incluidos en el TCGA se detecta también una mayor frecuencia de pacientes con deleciones en *CDKN2A* y alteraciones en *EGFR* en el grupo Non- LTS, pero en este caso la diferencia es estadísticamente significativa (64% frente a 57% en el caso de *CDKN2A* y 55% frente a 35% en el caso de *EGFR*). En cuanto a la supervivencia global, dentro de los casos incluidos en nuestra serie, se observa la tendencia a la peor supervivencia de aquellos GB con alteraciones en *CDKN2A* y *EGFR*, sin llegar a ser significativa esta diferencia. Sin embargo, esta tendencia no se observa dentro de la serie de GB del TCGA.

La amplificación del gen *EGFR* es una alteración característica en GBs, y se asocia a la activación de la vía de señalización del receptor de crecimiento epidérmico EGFR [145]. Diferentes estudios han analizado la asociación de la amplificación del gen *EGFR* y el pronóstico en el GB [146, 147, 148]. Sin embargo, existen resultados contradictorios en cuanto a la asociación de las alteraciones de *EGFR* y la supervivencia

Los resultados de Ma *et al.* [149], demuestran que aquellos GB sin mutaciones de IDH y con deleción homocigota de *CDKN2A* se asocian a peor supervivencia de manera independiente a otros factores pronósticos. Del mismo modo, en los resultados de Hsu *et al.* [150], las deleciones de *CDKN2A* se asocian a una peor supervivencia. Sin embargo, en ambos estudios observan que aquellos pacientes con deleciones de *CDKN2A* tienen mejor pronóstico cuando son tratados con altas dosis de radiación independientemente del grado de resección tumoral. El gen *CDKN2A* codifica para p16^{INK4A}, controlando el paso de la fase G1 a G2 en el ciclo celular [151]. Aquellas células en fase G2 son más sensibles a radiación, de manera que la ausencia de *CDKN2A*, incrementa el número de células en fase G2 y por lo tanto aumenta radiosensibilidad del tumor [152].

En cuanto a las mutaciones en el promotor del gen *TERT*, aunque los resultados obtenidos en nuestra serie no han sido estadísticamente significativos con respecto a la frecuencia de casos incluidos en cada uno de los grupos LTS y Non-LTS, se observó una mayor proporción de casos con mutaciones en el promotor de *TERT* dentro del grupo Non-LTS (68.5% vs 61.5%). El análisis de la frecuencia de mutaciones en el promotor de *TERT* dentro de la serie del TCGA no pudo realizarse, ya que no se encuentran publicados estos datos en CBioportal, siendo ésta una limitación dentro de nuestro estudio.

Sobre las mutaciones en el promotor de *TERT*, algunos estudios indican que se asocian a peor pronóstico en gliomas IDH no mutado grado 2 y 3. Sin embargo, la asociación de las mutaciones en el promotor de *TERT* en gliomas grado 4 no queda del todo establecida dentro de los diferentes estudios publicados [39, 40, 42, 153, 154]. En nuestra serie, aquellos casos con alteraciones en el promotor de *TERT* presentan peores supervivencias que aquellos sin mutaciones (mediana de supervivencia de 17.5 vs 18.9 meses, respectivamente), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

Los resultados de Hsu *et al.* [155] mostraron que los pacientes con mutaciones en el promotor de *TERT* que han recibido dosis más bajas de radiación tienen peor supervivencia. Las mutaciones en el promotor de *TERT* provocan la reactivación de la actividad telomerasa traduciéndose en una respuesta más activa al daño del ADN y una menor sensibilidad a tratamientos que dañan el ADN, como la radiación [156, 157]. Por lo tanto, en GBs sin mutaciones de IDH, la respuesta a tratamiento radioterápico puede ser más o menos efectivo en función de algunas alteraciones genéticas en particular, como pueden ser la delección de *CDKN2A* y la mutación del promotor de *TERT*. En los resultados de este grupo, se sugiere que los GBs con delecciones de *CDKN2A* y mutaciones de *TERT* se asocian a una menor supervivencia, pudiéndose beneficiar de dosis más altas de radiación.

Por lo tanto, podemos concluir que aún no está bien definido el valor pronóstico de alteraciones tan frecuentes en GB como la amplificación de *EGFR*, la mutación del promotor de *TERT* o la delección de *CDKN2A* en GB sin mutaciones de IDH [141, 142]. Sin embargo, en astrocitomas IDH mutados, el papel de la delección de *CDKN2A* y su relación con el peor pronóstico de los pacientes está bien demostrada [143, 144]. Prueba de ello es su inclusión como un factor que determina el grado 4 de malignidad en astrocitomas IDH mutados en la nueva clasificación de la OMS.

7.3. ANALISIS DE GB CON CÉLULAS GIGANTES

Cabe destacar el hallazgo en nuestra serie de un interesante grupo de pacientes con alteraciones en los genes implicados en la remodelación de la cromatina *ATRX* y *DAXX* en ausencia de mutaciones concomitantes de IDH o *H3F3A*, que presentan células gigantes en la histología y tienen un mejor pronóstico. A raíz de este hallazgo inicial se realizó un estudio más amplio de GB con presencia de células gigantes en la histología y ausencia de mutaciones en IDH o *H3F3A*. Autores como Oh y colaboradores [160, 161] ya detectaron en sus estudios un grupo de GB

con pérdida de tinción inmunohistoquímica de ATRX sin alteraciones en otros genes, como IDH, con presencia de células gigantes.

Existen trabajos previos en los que se evidencian las características clínicas propias que presentan aquellos pacientes con GB con células gigantes, siendo dichos pacientes, en general, pacientes más jóvenes y con mejor pronóstico con respecto al GB que no presenta estas células gigantes [162, 163]. Sin embargo, las alteraciones moleculares que subyacen al GB con células gigantes todavía no se han definido claramente. Todo esto hace que estos tumores aún se encuentren en la clasificación de la OMS como un subtipo de GB tipificado en base únicamente a sus características morfológicas.

Se sabe que estos tumores raramente presentan mutaciones en IDH, sin embargo, los tumores con mutaciones en IDH pueden presentar células gigantes multinucleadas en la histología. La ausencia de unos parámetros histológicos y moleculares bien definidos que permitan clasificar estos tumores dificulta en muchas ocasiones su identificación. Al no existir un porcentaje exacto de células gigantes multinucleadas a tener en cuenta para el diagnóstico, existen ocasiones en las que en los informes histológicos no se describe la presencia de células gigantes multinucleadas. En consecuencia, es necesaria una definición más objetiva de este subtipo de tumores, que correlacionen parámetros moleculares e histológicos, para permitir un diagnóstico más preciso.

Dentro de nuestra serie de GBs con presencia de células gigantes (36 casos en total), 14 de los pacientes tenían un diagnóstico definido como GB de células gigantes, sin embargo 22 pacientes tuvieron un diagnóstico de GB y sólo en la descripción histológica de la pieza se describía la presencia de células gigantes multinucleadas. Se evidencia así la necesidad de unos parámetros claros y objetivos para el diagnóstico de estos casos.

Los resultados obtenidos en la serie de GBs con presencia de células gigantes mediante secuenciación del panel NGS-GLIO-30, muestran una alta frecuencia de alteraciones en *TP53* (100%) y menor frecuencia de amplificaciones de *EGFR* y deleciones de *CDKN2A* con respecto al GB, en concordancia con los resultados obtenidos por otros autores [160, 164, 165, 166]. Del mismo modo, al igual que los resultados arrojados por Oh *et al.*, nuestra serie muestra mayor incidencia de alteraciones en *ATRX*, y menor en el promotor de *TERT*, al comparar con el GB en general. Los resultados obtenidos muestran que estas diferencias se hacen más notables al fijar el porcentaje de células gigantes en un 30%. Al establecer este porcentaje, hasta el 50% de los casos presentaban alteraciones en *ATRX*, solamente el 11% de los casos mutaciones en *pTERT* y el 12% amplificaciones de *EGFR*.

Asimismo, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral destacan la mayor frecuencia de casos con mutaciones en *RB1* y *NF1* en aquellos GBs con más de un 30% de células gigantes en su histología. Al analizar la serie de GB publicados en el TCGA (se analizaron aquellos casos que, al igual que en la serie analizada, presentaban

mutaciones en *TP53* con más de un 30% de células gigantes), se observó que las alteraciones genéticas presentes en estos tumores son las mismas que en nuestra serie, validándose así los resultados obtenidos.

De esta manera, aquellos GB con más de un 30% de células gigantes se caracterizan por presentar alteraciones en *TP53*, y una mayor frecuencia de alteraciones en *ATRX*, *NF1* y *RB1* y una menor frecuencia de alteraciones *EGFR* y *CDKN2A* comparando con GB sin células gigantes.

Las alteraciones en *TP53* se dan en todos los tipos de cánceres (167). *TP53* actúa como regulador del ciclo celular, así como en la duplicación del centrosoma, teniendo así un papel fundamental en la estabilidad genómica [168, 169]. El hecho de que todos los casos con más de un 30% de células gigantes presentasen alteraciones en *TP53*, podría sugerir que este gen tiene un papel fundamental en la presencia de estas células gigantes de estos GBs. Esta hipótesis concuerda con los resultados de Meyer-Puttitz *et al.* [164] mostrando diferencias a nivel molecular de GB de células gigantes con y sin mutaciones de *IDH* a través de un mecanismo de inestabilidad genómica dependiente *TP53*.

Como se ha mencionado anteriormente, las células neoplásicas necesitan mantener la longitud de los telómeros para ser inmortales. Este mantenimiento puede ocurrir mediante activación de la telomerasa o mediante el mecanismo ALT. Las mutaciones en *ATRX* (o la pérdida de expresión de la proteína) se han asociado a la activación del mecanismo ALT [47] y las mutaciones en *pTERT* se asocian a activación de la telomerasa, siendo ambos eventos mutuamente excluyentes en tumores del SNC. En GB sin mutaciones en *IDH*, el mantenimiento de telómeros se produce principalmente mediante mutaciones en *pTERT*, mientras que en aquellos astrocitomas con mutaciones en *IDH* se observa una mayor frecuencia de mutaciones en *ATRX*. En la serie de casos de GBs con células gigantes analizada aquí, que no presentan mutaciones en *IDH*, se observa una mayor frecuencia de alteraciones en *ATRX* y prácticamente ausencia de alteraciones en *pTERT*, sugiriendo que en estos tumores el mantenimiento de la longitud de telómeros se produciría mediante activación de ALT y no mediante la activación de la telomerasa, si bien diferentes estudios sugieren que la alteración de *ATRX* por sí sola no es suficiente para la activación de ALT, requiriéndose mutaciones en otros genes como *IDH1*, *TP53* o *H3F3A* [170]. En el estudio aquí presentado, la ausencia de mutaciones en *IDH* o *H3F3A* y la presencia de alteración de *TP53* en todos los casos, podría sugerir que *TP53* podría tener un papel en la activación del mecanismo ALT en el GB con células gigantes.

Con el fin de poder establecer mayores diferencias cuanto al perfil genético de los tumores con presencia de células gigantes y aquellos sin células gigantes, realizamos un estudio de carga mutacional en nuestra serie. La mayoría de los tumores con células gigantes presentaron una carga mutacional baja en concordancia con lo ya publicado recientemente por Shi *et al.* [162]. Sin embargo, 2 tumores presentaron una carga mutacional muy alta. Analizando las mutaciones de estos

casos, uno de ellos presentaba mutación del gen *POLE* y el otro presentaba mutación en *MSH2*, ambos genes implicados en mecanismos de estabilidad genómica, cuya alteración provoca la hipermutación del material genético, incrementando así la carga mutacional de estos tumores.

Se han identificado mutaciones en *POLE* en pacientes con gliomas de alto grado sin mutaciones en IDH y con un fenotipo hipermutado, al igual que en caso aquí detectado [172]. Además, estos tumores, presentan características histopatológicas similares entre ellos, y al igual que en el caso detectado en esta serie, presentan células gigantes multinucleadas [172]. EL fenotipo hipermutado de estos tumores, los hace susceptibles de tratamiento con inmunoterapia con inhibidores “checkpoint” como los inhibidores de PD-1 o PD-L1 [173, 174].

Muy recientemente, los resultados Barresi *et al.* [175] concuerdan con los resultados mostrados en este trabajo. Estos autores analizan una serie de GBs con células gigantes en los que concluyen que estos tumores se podrían caracterizar por ser una entidad diferente al Astrocitoma IDH mutado, grado 4 o al GB-IDHwt caracterizada por la presencia de al menos un 30% de células gigantes multinucleadas y alteraciones en mayor frecuencia de TP53, RB1, NF1 y genes remodeladores de cromatina. Del mismo modo, al igual que en nuestros resultados, estos autores detectan mutaciones de *POLE* asociadas a GB con células gigantes en uno de los casos analizados con carga mutacional alta.

Con respecto a la supervivencia del GB de células gigantes, en nuestra serie observamos una supervivencia más larga en aquellos pacientes de GB con más de un 30% de células gigantes, a pesar de que el estudio no alcanza significación estadística, quizá por el número de casos incluidos. Esto se apoya porque al sumar los casos de nuestra serie con los casos del TCGA sí se evidencia una diferencia estadísticamente significativa en la supervivencia global.

Por lo tanto, mediante la integración de los datos histológicos y moleculares de estos tumores, se ha podido demostrar la asociación de las alteraciones de TP53 y ATRX en GBs con células gigantes. En base a los resultados obtenidos, se ha fijado un punto de corte para definir el GB de células gigantes, de manera que se propone que la presencia de un 30% de células gigantes multinucleadas o más en el tumor estaría correlacionando esta característica histológica con las alteraciones moleculares mencionadas, principalmente la presencia de alteración en TP53, ATRX.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1- Se ha diseñado y validado un panel de genes de secuenciación masiva (NGS) aplicable a la rutina diagnóstica de gliomas cubriendo los principales genes alterados en este tipo de tumores. Este panel permite el análisis de SNVs, INDELS y CNVs en GBs con una alta especificidad y sensibilidad.
- 2- La edad, extensión de la cirugía y el síntoma de inicio son factores pronósticos en el GB. Los pacientes más jóvenes, sometidos a extirpaciones extensas del tumor, y aquellos que debutan con crisis epilépticas presentan supervivencias globales más largas.
- 3- La SG mediana de los pacientes con mutaciones en *IDH1/2* es de 50 meses (rango, 29-70), confirmándose así el valor pronóstico de la mutación en el gen *IDH* en los gliomas. Otros genes alterados asociados a mejor pronóstico dentro de aquellos GB sin mutaciones en *IDH* son las alteraciones en *PTEN*. Del mismo modo, las alteraciones asociadas con un peor pronóstico se detectaron en los genes *PIK3CA*, *CDKN2A* y en el promotor del gen *TERT*.
- 4- Los GBs con alteraciones en *ATRX* sin alteraciones en otros genes concomitantes como *IDH1*, *IDH2*, *H3F3A* presentan mejores supervivencias además de caracterizarse por la presencia de células gigantes multinucleadas.
- 5- El perfil molecular que caracteriza los GBs de células gigantes es el siguiente: mutaciones en *TP53* en todos los casos, frecuentes alteraciones en *ATRX*, una mayor frecuencia de mutaciones en *RB1* y *NF1*, una menor frecuencia de alteraciones en *IDH*, *EGFR* y *CDKN2A*, así como una carga mutacional baja.
- 6- Se ha establecido un punto de corte en el porcentaje de células gigantes presentes en el tumor del 30% para poder definir el subtipo de GB de células gigantes, que correlaciona con el patrón molecular descrito y una tendencia a un mejor pronóstico en términos de SG.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Informe de 2021 de la sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). “Las cifras del cáncer en España”. www.seom.org
2. Asociación española contra el cancer (AECC). www.contraelcancer.es. Tipos de cáncer. Sistema nervioso central.
3. Ostrom QT, Cioffi G, Gittleman H, Patil N, Waite K, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012-2016. *Neuro Oncol.* 2019 Nov 1;21(Suppl 5):v1-v100. doi: 10.1093/neuonc/noz150. PMID: 31675094
4. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD et al. (Eds.), (2007). World Health Organization classification of tumours of the central nervous system. International Agency for Research on Cancer, Lyon
5. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* 2016;131:803-20
6. Lai A, Kharbanda S, Pope WB, et al. Evidence for sequenced molecular evolution of IDH1 mutant glioblastoma from a distinct cell of origin. *J Clin Oncol.* 2011 Dec 1;29(34):4482-90. doi: 10.1200/JCO.2010.33.8715. Epub 2011 Oct 24. PMID: 22025148; PMCID: PMC3236649.
7. Nobusawa S, Watanabe T, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. *Clin Cancer Res.* 2009 Oct 1;15(19):6002-7. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0715. Epub 2009 Sep 15. PMID: 19755387.
8. Ohaki H, Kleihues P. Genetics pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 2007;170:1445-53
9. Winger MJ, Macdonald DR, Cairncross JG. Supratentorial anaplastic gliomas in adults. The prognostic importance of extent of resection and prior low-grade glioma. *J Neurosurg* 1989;71:487-93.
10. Lacroix M, Abi-Said D, Fourney DR, et al. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg.* 2001 Aug;95(2):190-8. doi: 10.3171/jns.2001.95.2.0190. PMID: 11780887.
11. Stupp R, Mason WP, Van den Bent MJ, et al. 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 Mar 10;352(10):987-96. doi: 10.1056/NEJMoa043330. PMID: 15758009.

12. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, Van den Bent MJ, et al. 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 May;10(5):459-66. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70025-7. Epub 2009 Mar 9. PMID: 19269895.
13. 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 Sep;25 Suppl 3:iii93-101. doi: 10.1093/annonc/mdu050. Epub 2014 Apr 29. PMID: 24782454.
14. Wesolowski JR, Rajdev P, Mukherji SK. Temozolomide (Temodar). *AJNR Am J Neuroradiol*. 2010 Sep;31(8):1383-4. doi: 10.3174/ajnr.A2170. Epub 2010 Jun 10. PMID: 20538821; PMCID: PMC7966084.
15. Louis DN, Perry A, Wesseling P, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol*. 2021 Aug 2;23(8):1231-1251. doi: 10.1093/neuonc/noab106. PMID: 34185076; PMCID: PMC8328013.
16. Krex D, Klink B, Hartmann C, et al. German Glioma Network. Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain*. 2007 Oct;130(Pt 10):2596-606. doi: 10.1093/brain/awm204. Epub 2007 Sep 4. PMID: 17785346.
17. Sonoda Y, Kumabe T, Watanabe M, et al. Long-term survivors of glioblastoma: clinical features and molecular analysis. *Acta Neurochir (Wien)* 2009;151(11):1349-1358. doi: 10.1007/s00701-009-0387-1.
18. Gately L, Collins A, Murphy M, Dowling A. Age alone is not a predictor for survival in glioblastoma. *J Neurooncol*. 2016;129:479-485.
19. Lu J, Cowperthwaite MC, Burnett MG, Shpak M. Molecular predictors of long-term survival in glioblastoma multiforme patients. *PLoS One*. 2016; 11:e0154313.
20. Gately L, McLachlan SA, Philip J, et al. Molecular profile of long-term survivors of glioblastoma: a scoping review of the literature. *J Clin Neurosci*. 2019;68:1-8.
21. Shu C, Wang Q, Yan X, Wang J. The TERT promoter mutation status and MGMT promoter methylation status, combined with dichotomized MRI-derived and clinical features, predict adult primary glioblastoma survival. *Cancer Med*. 2018;7: 3704-3712.
22. Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*. 2008 Sep 26;321(5897):1807-12. doi: 10.1126/science.1164382. Epub 2008 Sep 4. PMID: 18772396; PMCID: PMC2820389.
23. Brat DJ, Verhaak RG, Aldape KD, et al. Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *N Engl J Med* 2015;372:2481-98

24. Dunn GP, Andronesi OC, Cahill DP. From genomics to the clinic: biological and translational insights of mutant IDH1/2 in glioma. *Neurosurg Focus*. 2013 Feb;34(2):E2. doi: 10.3171/2012.12.FOCUS12355. PMID: 23373447.
25. Yan H, Parsons DW, Jin G, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med*. 2009 Feb 19;360(8):765-73. doi: 10.1056/NEJMoa0808710. PMID: 19228619; PMCID: PMC2820383.
26. Arita H, Narita Y, Yoshida A, et al. IDH1/2 mutation detection in gliomas. *Brain Tumor Pathol*. 2015 Apr;32(2):79-89. doi: 10.1007/s10014-014-0197-x. Epub 2014 Jul 10. PMID: 25008158.
27. Dang L, White DW, Gross S, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*. 2009 Dec 10;462(7274):739-44. doi: 10.1038/nature08617. PMID: 19935646; PMCID: PMC2818760. *N Engl J Med* 2009; 360:765-73
28. Yan H, Parsons DW, Jin G, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med*. 2009 Feb 19;360(8):765-73. doi: 10.1056/NEJMoa0808710. PMID: 19228619; PMCID: PMC2820383.
29. Waitkus MS, Diplas BH, Yan H. Isocitrate dehydrogenase mutations in gliomas. *Neuro Oncol*. 2016 Jan;18(1):16-26. doi: 10.1093/neuonc/nov136. Epub 2015 Jul 16. PMID: 26188014; PMCID: PMC4677412.
30. Seguí N, Pineda M, Guinó E, et al. Telomere length and genetic anticipation in Lynch syndrome. *PLoS One*. 2013 Apr 23;8(4):e61286. doi:10.1371/journal.pone.0061286. PMID: 23637804; PMCID: PMC3634050.
31. Fan HC, Chen CM, Chi CS, et al. Targeting Telomerase and ATRX/DAXX Inducing Tumor Senescence and Apoptosis in the Malignant Glioma. *Int J Mol Sci*. 2019 Jan 8;20(1):200. doi: 10.3390/ijms20010200. PMID: 30625996; PMCID: PMC6337644.
32. Blasco MA. Telomere length, stem cells and aging. *Nat Chem Biol*. 2007 Oct;3(10):640-9. doi: 10.1038/nchembio.2007.38. PMID: 17876321.
33. Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet*. 2005 Aug;6(8):611-22. doi: 10.1038/nrg1656. PMID: 16136653.
34. Becker, T, Haferkamp, S, Inuzuka, H, et al. Molecular Mechanisms of Cellular Senescence and Senescence-Related Disorders [Internet]. London: IntechOpen; 2013 [cited 2022 Oct 27]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/43112> doi: 10.5772/54120
35. Broccoli D, Young JW, de Lange T. Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Sep 26;92(20):9082-6. doi: 10.1073/pnas.92.20.9082. PMID: 7568077; PMCID: PMC40928.
36. Harley CB, Kim NW, Prowse KR, et al. Telomerase, cell immortality, and cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1994;59:307-15. doi: 10.1101/sqb.1994.059.01.035. PMID: 7587082.

37. Weng NP, Levine BL, June CH, et al. Regulated expression of telomerase activity in human T lymphocyte development and activation. *J Exp Med*. 1996 Jun 1;183(6):2471-9. doi: 10.1084/jem.183.6.2471. PMID: 8676067; PMCID: PMC2192611.
38. Killela PJ, Reitman ZJ, Jiao Y, et al. 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 Apr 9;110(15):6021-6. doi: 10.1073/pnas.1303607110. Epub 2013 Mar 25. PMID: 23530248; PMCID: PMC3625331.
39. Powter B, Jeffreys SA, Sareen H, et al. Human TERT promoter mutations as a prognostic biomarker in glioma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2021 Apr;147(4):1007-1017. doi: 10.1007/s00432-021-03536-3. Epub 2021 Feb 6. PMID: 33547950; PMCID: PMC7954705.
40. Mosrati MA, Malmström A, Lysiak M, et al. TERT promoter mutations and polymorphisms as prognostic factors in primary glioblastoma. *Oncotarget*. 2015 Jun 30;6(18):16663-73. doi: 10.18632/oncotarget.4389. PMID: 26143636; PMCID: PMC4599297.
41. You H, Wu Y, Chang K, et al. Paradoxical prognostic impact of TERT promoter mutations in gliomas depends on different histological and genetic backgrounds. *CNS Neurosci Ther*. 2017 Oct;23(10):790-797. doi: 10.1111/cns.12724. Epub 2017 Sep 3. PMID: 28868656; PMCID: PMC6492727.
42. Lee Y, Koh J, Kim SI, et al. The frequency and prognostic effect of TERT promoter mutation in diffuse gliomas. *Acta Neuropathol Commun*. 2017 Aug 29;5(1):62. doi: 10.1186/s40478-017-0465-1. PMID: 28851427; PMCID: PMC5574236.
43. Huang DS, Wang Z, He XJ, et al. Recurrent TERT promoter mutations identified in a large-scale study of multiple tumour types are associated with increased TERT expression and telomerase activation. *Eur J Cancer*. 2015 May;51(8):969-76. doi: 10.1016/j.ejca.2015.03.010. Epub 2015 Apr 2. PMID: 25843513; PMCID: PMC4467782.
44. Akyerli CB, Yüksel Ş, Can Ö, et al. Use of telomerase promoter mutations to mark specific molecular subsets with reciprocal clinical behavior in IDH mutant and IDH wild-type diffuse gliomas. *J Neurosurg*. 2018 Apr;128(4):1102-1114. doi: 10.3171/2016.11.JNS16973. Epub 2017 Jun 16. PMID: 28621624.
45. Bryan TM, Englezou A, Dalla-Pozza L, et al. Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nat Med*. 1997 Nov;3(11):1271-4. doi: 10.1038/nm1197-1271. PMID: 9359704.
46. Clynes D, Gibbons RJ. ATRX and the replication of structured DNA. *Curr Opin Genet Dev*. 2013 Jun;23(3):289-94. doi: 10.1016/j.gde.2013.01.005. Epub 2013 Feb 28. PMID: 23453691.

47. Heaphy CM, de Wilde RF, Jiao Y, et al. Altered telomeres in tumors with ATRX and DAXX mutations. *Science*. 2011 Jul 22;333(6041):425. doi: 10.1126/science.1207313. Epub 2011 Jun 30. PMID: 21719641; PMCID: PMC3174141.
48. Haberler C, Wöhrer A. Clinical Neuropathology practice news 2-2014: ATRX, a new candidate biomarker in gliomas. *Clin Neuropathol*. 2014 Mar-Apr;33(2):108-11. doi: 10.5414/np300758. PMID: 24559763; PMCID: PMC3967248.
49. Ohba S, Kuwahara K, Yamada S, et al. Correlation between IDH, ATRX, and TERT promoter mutations in glioma. *Brain Tumor Pathol*. 2020 Apr;37(2):33-40. doi: 10.1007/s10014-020-00360-4. Epub 2020 Mar 29. PMID: 32227259.
50. Alshiekh Nasany R, de la Fuente MI. Therapies for IDH-Mutant Gliomas. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2023 May;23(5):225-233. doi: 10.1007/s11910-023-01265-3. Epub 2023 Apr 15. PMID: 37060388; PMCID: PMC10182950.
51. Mellinghoff IK, van den Bent MJ, Blumenthal DT, et al. Vorasidenib in IDH1- or IDH2-Mutant Low-Grade Glioma. *N Engl J Med*. 2023 Jun 4. doi: 10.1056/NEJMoa2304194. Epub ahead of print. PMID: 37272516.
52. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*. 2008 Oct 23;455(7216):1061-8. doi: 10.1038/nature07385. Epub 2008 Sep 4. Erratum in: *Nature*. 2013 Feb 28;494(7438):506. PMID: 18772890; PMCID: PMC2671642.
53. Brennan CW, Verhaak RG, McKenna A, et al. ; TCGA Research Network. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell*. 2013 Oct 10;155(2):462-77. doi: 10.1016/j.cell.2013.09.034. Erratum in: *Cell*. 2014 Apr 24;157(3):753. PMID: 24120142; PMCID: PMC3910500.
54. Jansen M, Yip S, Louis DN. Molecular pathology in adult gliomas: diagnostic, prognostic, and predictive markers. *Lancet Neurol*. 2010 Jul;9(7):717-26. doi: 10.1016/S1474-4422(10)70105-8. PMID: 20610347; PMCID: PMC3079431.
55. Louis DN. Molecular pathology of malignant gliomas. *Annu Rev Pathol*. 2006;1:97-117. doi: 10.1146/annurev.pathol.1.110304.100043. PMID: 18039109.
56. Srivenugopal KS, Yuan XH, Friedman HS, et al. Ubiquitination-dependent proteolysis of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human and murine tumor cells following inactivation with O6-benzylguanine or 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Biochemistry*. 1996 Jan 30;35(4):1328-34. doi: 10.1021/bi9518205. PMID: 8573590.
57. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med*. 2000 Nov 9;343(19):1350-4. doi: 10.1056/NEJM200011093431901. Erratum in: *N Engl J Med* 2000 Dec 7;343(23):1740. PMID: 11070098.
58. Van den Bent MJ. Interobserver variation of the histopathological diagnosis in clinical trials on glioma: a clinician's perspective. *Acta Neuropathol*. 2010 Sep;120(3):297-304. doi: 10.1007/s00401-010-0725-7. Epub 2010 Jul 20. PMID: 20644945; PMCID: PMC2910894.

59. Eckel-Passow JE, Lachance DH, Molinaro AM, et al. Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors. *N Engl J Med*. 2015 Jun 25;372(26):2499-508. doi: 10.1056/NEJMoa1407279. Epub 2015 Jun 10. PMID: 26061753; PMCID: PMC4489704.
60. Sturm D, Witt H, Hovestadt V, et al. Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. *Cancer Cell*. 2012 Oct 16;22(4):425-37. doi: 10.1016/j.ccr.2012.08.024. PMID: 23079654.
61. Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*. 2008 Sep 26;321(5897):1807-12. doi: 10.1126/science.1164382. Epub 2008 Sep 4. PMID: 18772396; PMCID: PMC2820389.
62. Cancer Genome Atlas Research Network, Brat DJ, Verhaak RG, Aldape et al. Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *N Engl J Med*. 2015 Jun 25;372(26):2481-98. doi: 10.1056/NEJMoa1402121. Epub 2015 Jun 10. PMID: 26061751; PMCID: PMC4530011.
63. Tesileanu CMS, Dirven L, Wijnenga MMJ, et al. Survival of diffuse astrocytic glioma, IDH1/2 wildtype, with molecular features of glioblastoma, WHO grade IV: a confirmation of the cIMPACT-NOW criteria. *Neuro Oncol*. 2020 Apr 15;22(4):515-523. doi: 10.1093/neuonc/noz200. PMID: 31637414; PMCID: PMC7158657.
64. Gerber NK, Goenka A, Turcan S, et al. Transcriptional diversity of long-term glioblastoma survivors. *Neuro Oncol*. 2014 Sep;16(9):1186-95. doi: 10.1093/neuonc/nou043. Epub 2014 Mar 23. PMID: 24662514; PMCID: PMC4136896.
65. Komori T. The 2021 WHO classification of tumors, 5th edition, central nervous system tumors: the 10 basic principles. *Brain Tumor Pathol*. 2022 Apr;39(2):47-50. doi: 10.1007/s10014-022-00428-3. PMID: 35316415.
66. Brat DJ, Aldape K, Colman H, et al. cIMPACT-NOW update 3: recommended diagnostic criteria for "Diffuse astrocytic glioma, IDH-wildtype, with molecular features of glioblastoma, WHO grade IV". *Acta Neuropathol*. 2018 Nov;136(5):805-810. doi: 10.1007/s00401-018-1913-0. Epub 2018 Sep 26. PMID: 30259105; PMCID: PMC6204285.
67. Ortega A, Nuño M, Walia S, et al. Treatment and survival of patients harboring histological variants of glioblastoma. *J Clin Neurosci*. 2014 Oct;21(10):1709-13. doi: 10.1016/j.jocn.2014.05.003. Epub 2014 Jun 26. PMID: 24980627.
68. Kozak KR, Moody JS. Giant cell glioblastoma: a glioblastoma subtype with distinct epidemiology and superior prognosis. *Neuro Oncol*. 2009 Dec;11(6):833-41. doi: 10.1215/15228517-2008-123. PMID: 19332771; PMCID: PMC2802403.
69. Han SJ, Yang I, Tihan T, et al. Primary gliosarcoma: key clinical and pathologic distinctions from glioblastoma with implications as a unique oncologic entity. *J Neurooncol*. 2010 Feb;96(3):313-20. doi: 10.1007/s11060-009-9973-6. Epub 2009 Jul 18. PMID: 19618114; PMCID: PMC2808523.

70. Lutterbach J, Guttenberger R, Pagenstecher A. Gliosarcoma: a clinical study. *Radiother Oncol.* 2001 Oct;61(1):57-64. doi: 10.1016/s0167-8140(01)00415-7. PMID: 11578729.
71. Galanis E, Buckner JC, Dinapoli RP, et al. Clinical outcome of gliosarcoma compared with glioblastoma multiforme: North Central Cancer Treatment Group results. *J Neurosurg.* 1998 Sep;89(3):425-30. doi: 10.3171/jns.1998.89.3.0425. PMID: 9724117.
72. Lee D, Kang SY, Suh YL, et al. Clinicopathologic and genomic features of gliosarcomas. *J Neurooncol.* 2012 May;107(3):643-50. doi: 10.1007/s11060-011-0790-3. Epub 2012 Jan 20. PMID: 22270848.
73. Momota H, Iwami K, Fujii M, et al. Rhabdoid glioblastoma in a child: case report and literature review. *Brain Tumor Pathol.* 2011 Feb;28(1):65-70. doi: 10.1007/s10014-010-0010-4. Epub 2011 Jan 7. PMID: 21213124.
74. Kleinschmidt-DeMasters BK, Aisner DL, Birks DK, et al.. Epithelioid GBMs show a high percentage of BRAF V600E mutation. *Am J Surg Pathol.* 2013 May;37(5):685-98. doi: 10.1097/PAS.0b013e31827f9c5e. PMID: 23552385; PMCID: PMC4610349.
75. Broniscer A, Gajjar A. Supratentorial high-grade astrocytoma and diffuse brainstem glioma: two challenges for the pediatric oncologist. *Oncologist.* 2004;9(2):197-206. doi: 10.1634/theoncologist.9-2-197. PMID: 15047924.
76. Do H, Dobrovic A. Dramatic reduction of sequence artefacts from DNA isolated from formalin-fixed cancer biopsies by treatment with uracil- DNA glycosylase. *Oncotarget.* 2012 May;3(5):546-58. doi: 10.18632/oncotarget.503. PMID: 22643842; PMCID: PMC3388184.
77. Frampton GM, Fichtenholtz A, Otto GA, et al. Development and validation of a clinical cancer genomic profiling test based on massively parallel DNA sequencing. *Nat Biotechnol.* 2013 Nov;31(11):1023-31. doi: 10.1038/nbt.2696. Epub 2013 Oct 20. PMID: 24142049; PMCID: PMC5710001.
78. Eijkelenboom A, Tops BBJ, Van den Berg A, et al. Recommendations for the clinical interpretation and reporting of copy number gains using gene panel NGS analysis in routine diagnostics. *Virchows Arch.* 2019 Jun;474(6):673-680. doi: 10.1007/s00428-019-02555-3. Epub 2019 Mar 19. PMID: 30888490; PMCID: PMC6581937.
79. Li MM, Datto M, Duncavage EJ, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn.* 2017 Jan;19(1):4-23. doi: 10.1016/j.jmoldx.2016.10.002. PMID: 27993330; PMCID: PMC5707196.
80. Gerardo Valadez J, Grover VK, Carter MD, et al. Identification of Hedgehog pathway responsive glioblastomas by isocitrate dehydrogenase mutation. *Cancer Lett.* 2013 Jan 28;328(2):297-306. doi: 10.1016/j.canlet.2012.10.002. Epub 2012 Oct 11. PMID: 23063752; PMCID: PMC4308293.

81. Bodian DL, McCutcheon JN, Kothiyal P, et al. Germline variation in cancer-susceptibility genes in a healthy, ancestrally diverse cohort: implications for individual genome sequencing. *PLoS One*. 2014 Apr 11;9(4):e94554. doi: 10.1371/journal.pone.0094554. PMID: 24728327; PMCID: PMC3984285.
82. Hartmann C, Hentschel B, Simon M, et al. German Glioma Network. Long-term survival in primary glioblastoma with versus without isocitrate dehydrogenase mutations. *Clin Cancer Res*. 2013 Sep 15;19(18):5146-57. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0017. Epub 2013 Aug 5. PMID: 23918605.
83. Reifenberger G, Weber RG, Riehm V, et al. German Glioma Network. Molecular characterization of long-term survivors of glioblastoma using genome- and transcriptome-wide profiling. *Int J Cancer*. 2014 Oct 15;135(8):1822-31. doi: 10.1002/ijc.28836. Epub 2014 Mar 28. PMID: 24615357.
84. Amelot A, De Cremoux P, Quillien V, et al.. IDH-Mutation Is a Weak Predictor of Long-Term Survival in Glioblastoma Patients. *PLoS One*. 2015 Jul 9;10(7):e0130596. doi: 10.1371/journal.pone.0130596. PMID: 26158269; PMCID: PMC4497660.
85. Chaudhary R, Quagliata L, Martin JP, et al. A scalable solution for tumor mutational burden from formalin-fixed, paraffin-embedded samples using the OncoPrint Tumor Mutation Load Assay. *Transl Lung Cancer Res*. 2018 Dec;7(6):616-630. doi: 10.21037/tlcr.2018.08.01. PMID: 30505706; PMCID: PMC6249619.
86. Chan AK, Yao Y, Zhang Z, et al. Combination genetic signature stratifies lower-grade gliomas better than histological grade. *Oncotarget*. 2015 Aug 28;6(25):20885-901. doi: 10.18632/oncotarget.4928. PMID: 26369702; PMCID: PMC4673237.
87. Wesseling P, van den Bent M, Perry A. Oligodendroglioma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol*. 2015 Jun;129(6):809-27. doi: 10.1007/s00401-015-1424-1. Epub 2015 May 6. PMID: 25943885; PMCID: PMC4436696.
88. Application and Mechanism of Malonic Acid as a Green Alternative for Protein-Cross-linking. *Green and Sustainable Chemistry*, 2016, 6, 110-115 Published Online May 2016 in SciRes. <http://www.scirp.org/journal/gsc> <http://dx.doi.org/10.4236/gsc.2016.62010>
89. Feldman MY. Reactions of nucleic acids and nucleoproteins with formaldehyde. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1973;13:1-49. doi: 10.1016/s0079-6603(08)60099-9. PMID: 4573489.
90. Sikorsky JA, Primerano DA, Fenger TW, et al. DNA damage reduces Taq DNA polymerase fidelity and PCR amplification efficiency. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Apr 6;355(2):431-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.01.169. Epub 2007 Feb 7. PMID: 17303074; PMCID: PMC1945218.
91. Singh RR. Target Enrichment Approaches for Next-Generation Sequencing Applications in Oncology. *Diagnostics (Basel)*. 2022 Jun 24;12(7):1539. doi: 10.3390/diagnostics12071539. PMID: 35885445; PMCID: PMC9318977.
92. Teo SM, Pawitan Y, Ku CS, et al. Statistical challenges associated with detecting copy number variations with next-generation sequencing. *Bioinformatics*. 2012 Nov

- 1;28(21):2711-8. doi: 10.1093/bioinformatics/bts535. Epub 2012 Aug 31. PMID: 22942022.
93. Kerkhof J, Schenkel LC, Reilly J, et al. Clinical Validation of Copy Number Variant Detection from Targeted Next-Generation Sequencing Panels. *J Mol Diagn.* 2017 Nov;19(6):905-920. doi: 10.1016/j.jmoldx.2017.07.004. Epub 2017 Aug 15. PMID: 28818680.
94. Talevich E, Shain AH, Botton T, Bastian BC. CGenome-Wide Copy Number Detection and Visualization from Targeted DNA Sequencing. *PLoS Comput Biol.* 2016 Apr 21;12(4):e1004873. doi: 10.1371/journal.pcbi.1004873. PMID: 27100738; PMCID: PMC4839673.
95. Zhao M, Wang Q, Wang Q, et al. Computational tools for copy number variation (CNV) detection using next-generation sequencing data: features and perspectives. *BMC Bioinformatics.* 2013;14 Suppl 11(Suppl 11):S1. doi: 10.1186/1471-2105-14-S11-S1. Epub 2013 Sep 13. PMID: 24564169; PMCID: PMC3846878.
96. Abel HJ, Duncavage EJ. Detection of structural DNA variation from next generation sequencing data: a review of informatic approaches. *Cancer Genet.* 2013 Dec;206(12):432-40. doi: 10.1016/j.cancergen.2013.11.002. Epub 2013 Nov 20. PMID: 24405614; PMCID: PMC4441822.
97. Gurbich TA, Ilinsky VV. ClassifyCNV: a tool for clinical annotation of copy-number variants. *Sci Rep.* 2020 Nov 23;10(1):20375. doi: 10.1038/s41598-020-76425-3. PMID: 33230148; PMCID: PMC7683568.
98. Kuhnt D, Becker A, Ganslandt O, et al. Correlation of the extent of tumor volume resection and patient survival in surgery of glioblastoma multiforme with high-field intraoperative MRI guidance. *Neuro Oncol.* 2011 Dec;13(12):1339-48. doi: 10.1093/neuonc/nor133. Epub 2011 Sep 12. Erratum in: *Neuro Oncol.* 2014 Oct;16(10):1429. PMID: 21914639; PMCID: PMC3223093.
99. Richardson TE, Kumar A, Xing C, et al.. Overcoming the Odds: Toward a Molecular Profile of Long-Term Survival in Glioblastoma. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2020 Oct 1;79(10):1031-1037. doi: 10.1093/jnen/nlaa102. PMID: 32954439.
100. Madhugiri VS, Moiyadi AV, Shetty P, et al. Analysis of Factors Associated with Long-Term Survival in Patients with Glioblastoma. *World Neurosurg.* 2021 May;149:e758-e765. doi: 10.1016/j.wneu.2021.01.103. Epub 2021 Feb 1. PMID: 33540096.
101. Walid MS. Prognostic factors for long-term survival after glioblastoma. *Perm J.* 2008 Fall;12(4):45-8. doi: 10.7812/TPP/08-027. PMID: 21339920; PMCID: PMC3037140.
102. Fan X, Li Y, Shan X, et al.. Seizures at presentation are correlated with better survival outcomes in adult diffuse glioma: A systematic review and meta-analysis. *Seizure.* 2018 Jul;59:16-23. doi: 10.1016/j.seizure.2018.04.018. Epub 2018 Apr 25. PMID: 29727741.
103. Flanigan PM, Jahangiri A, Kuang R, et al. Improved Survival with Decreased Wait Time to Surgery in Glioblastoma Patients Presenting with Seizure. *Neurosurgery.* 2017 Nov 1;81(5):824-833. doi: 10.1093/neuros/nyx084. PMID: 28541497; PMCID: PMC6257017.

104. Czapski B, Baluszek S, Herold-Mende C, et al. Clinical and immunological correlates of long term survival in glioblastoma. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2018 Mar;22(1A):81-85. doi: 10.5114/wo.2018.73893. Epub 2018 Mar 5. PMID: 29628799; PMCID: PMC5885076.
105. Bleeker FE, Atai NA, Lamba S, et al. The prognostic IDH1(R132) mutation is associated with reduced NADP+-dependent IDH activity in glioblastoma. *Acta Neuropathol*. 2010 Apr;119(4):487-94. doi: 10.1007/s00401-010-0645-6. Epub 2010 Feb 4. PMID: 20127344; PMCID: PMC2841753.
106. SongTao Q, Lei Y, Si G, et al. IDH mutations predict longer survival and response to temozolomide in secondary glioblastoma. *Cancer Sci*. 2012 Feb;103(2):269-73. doi: 0.1111/j.1349-7006.2011.02134.x. Epub 2011 Nov 28. PMID: 22034964.
107. Cheng HB, Yue W, Xie C, et al. IDH1 mutation is associated with improved overall survival in patients with glioblastoma: a meta-analysis. *Tumour Biol*. 2013 Dec;34(6):3555-9. doi: 10.1007/s13277-013-0934-5. Epub 2013 Aug 1. PMID: 23904262.
108. Mandel JJ, Cachia D, Liu D, et al. Impact of IDH1 mutation status on outcome in clinical trials for recurrent glioblastoma. *J Neurooncol*. 2016 Aug;129(1):147-54. doi: 10.1007/s11060-016-2157-2. Epub 2016 Jun 7. PMID: 27270908; PMCID: PMC5021066.
109. Koh HJ, Lee SM, Son BG, et al. Cytosolic NADP+-dependent isocitrate dehydrogenase plays a key role in lipid metabolism. *J Biol Chem*. 2004 Sep 17;279(38):39968-74. doi: 10.1074/jbc.M402260200. Epub 2004 Jul 14. PMID: 15254034.
110. Badur MG, Muthusamy T, Parker SJ, et al. Oncogenic R132 IDH1 Mutations Limit NADPH for De Novo Lipogenesis through (D)2-Hydroxyglutarate Production in Fibrosarcoma Sells. *Cell Rep*. 2018 Oct 23;25(4):1018-1026.e4. doi: 10.1016/j.celrep.2018.09.074. Erratum in: *Cell Rep*. 2018 Nov 6;25(6):1680. PMID: 30355481; PMCID: PMC6613636.
111. Lee SH, Jo SH, Lee SM, et al. Role of NADP+-dependent isocitrate dehydrogenase (NADP+-ICDH) on cellular defence against oxidative injury by gamma-rays. *Int J Radiat Biol*. 2004 Sep;80(9):635-42. doi: 10.1080/09553000400007680. PMID: 15586883.
112. Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, et al. Cancer Genome Atlas Research Network. Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell*. 2010 May 18;17(5):510-22. doi: 10.1016/j.ccr.2010.03.017. Epub 2010 Apr 15. PMID: 20399149; PMCID: PMC2872684.
113. Maus A, Peters GJ. Glutamate and α -ketoglutarate: key players in glioma metabolism. *Amino Acids*. 2017 Jan;49(1):21-32. doi: 10.1007/s00726-016-2342-9. Epub 2016 Oct 17. Erratum in: *Amino Acids*. 2017 Jun;49(6):1143. PMID: 27752843; PMCID: PMC5241329.
114. Wang SI, Puc J, Li J, et al. Somatic mutations of PTEN in glioblastoma multiforme. *Cancer Res*. 1997 Oct 1;57(19):4183-6. PMID: 9331071.
115. Rasheed BK, Stenzel TT, McLendon RE, et al. PTEN gene mutations are seen in high-grade but not in low-grade gliomas. *Cancer Res*. 1997 Oct 1;57(19):4187-90. PMID: 9331072.

116. Ichimura K, Schmidt EE, Miyakawa A, et al. Distinct patterns of deletion on 10p and 10q suggest involvement of multiple tumor suppressor genes in the development of astrocytic gliomas of different malignancy grades. *Genes Chromosomes Cancer*. 1998 May;22(1):9-15. doi: 10.1002/(sici)1098-2264(199805)22:1<9::aid-gcc2>3.0.co;2-1. PMID: 9591629.
117. Tada K, Shiraishi S, Kamiryo T, et al. Analysis of loss of heterozygosity on chromosome 10 in patients with malignant astrocytic tumors: correlation with patient age and survival. *J Neurosurg*. 2001 Oct;95(4):651-9. doi: 10.3171/jns.2001.95.4.0651. PMID: 11596960.
118. Zhou XP, Li YJ, Hoang-Xuan K, et al. Mutational analysis of the PTEN gene in gliomas: molecular and pathological correlations. *Int J Cancer*. 1999 Apr 20;84(2):150-4. doi: 10.1002/(sici)1097-0215(19990420)84:2<150::aid-ijc10>3.0.co;2-#. PMID: 10096247.
119. Kraus JA, Glesmann N, Beck M, et al. Molecular analysis of the PTEN, TP53 and CDKN2A tumor suppressor genes in long-term survivors of glioblastoma multiforme. *J Neurooncol*. 2000 Jun;48(2):89-94. doi: 10.1023/a:1006402614838. PMID: 11083071.
120. Ohgaki H. Genetic pathways to glioblastomas. *Neuropathology*. 2005 Mar;25(1):1-7. doi: 10.1111/j.1440-1789.2004.00600.x. PMID: 15822813.
121. Tanaka S, Batchelor TT, Iafrate AJ, et al. PIK3CA activating mutations are associated with more disseminated disease at presentation and earlier recurrence in glioblastoma. *Acta Neuropathol Commun*. 2019 Apr 29;7(1):66. doi: 10.1186/s40478-019-0720-8. PMID: 31036078; PMCID: PMC6487518.
122. Brito C, Tomás A, Azevedo A, et al. *PIK3CA* Mutations in Diffuse Gliomas: An Update on Molecular Stratification, Prognosis, Recurrence, and Aggressiveness. *Clin Med Insights Oncol*. 2022 Jan 6;16:11795549211068804. doi: 10.1177/11795549211068804. PMID: 35023985; PMCID: PMC8743979.
123. Millis SZ, Jardim DL, Albacker L, et al.. Phosphatidylinositol 3-kinase pathway genomic alterations in 60,991 diverse solid tumors informs targeted therapy opportunities. *Cancer*. 2019 Apr 1;125(7):1185-1199. doi: 10.1002/cncr.31921. Epub 2018 Dec 24. PMID: 30582752; PMCID: PMC6433468.
124. Thorpe LM, Yuzugullu H, Zhao JJ. PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nat Rev Cancer*. 2015 Jan;15(1):7-24. doi: 10.1038/nrc3860. PMID: 25533673; PMCID: PMC4384662.
125. Martini M, De Santis MC, Braccini L, et al. PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review. *Ann Med*. 2014 Sep;46(6):372-83. doi: 10.3109/07853890.2014.912836. Epub 2014 Jun 5. PMID: 24897931.
126. Bauer TM, Patel MR, Infante JR. Targeting PI3 kinase in cancer. *Pharmacol Ther*. 2015 Feb;146:53-60. doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.09.006. Epub 2014 Sep 18. PMID: 25240910.
127. Oda K, Stokoe D, Taketani Y, et al. . High frequency of coexistent mutations of PIK3CA and PTEN genes in endometrial carcinoma. *Cancer Res*. 2005 Dec 1;65(23):10669-73. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2620. PMID: 16322209.

128. Zhang Y, Kwok-Shing Ng P, Kucherlapati M, et al.. A Pan-Cancer Proteogenomic Atlas of PI3K/AKT/mTOR Pathway Alterations. *Cancer Cell*. 2017 Jun 12;31(6):820-832.e3. doi: 10.1016/j.ccell.2017.04.013. Epub 2017 May 18. PMID: 28528867; PMCID: PMC5502825.
129. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science*. 2004 Apr 23;304(5670):554. doi: 10.1126/science.1096502. Epub 2004 Mar 11. PMID: 15016963.
130. Hartmann C, Bartels G, Gehlhaar C, et al.. PIK3CA mutations in glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol*. 2005 Jun;109(6):639-42. doi: 10.1007/s00401-005-1000-1. Epub 2005 May 28. PMID: 15924253.
131. Broderick DK, Di C, Parrett TJ, et al. Mutations of PIK3CA in anaplastic oligodendrogliomas, high-grade astrocytomas, and medulloblastomas. *Cancer Res*. 2004 Aug 1;64(15):5048-50. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1170. PMID: 15289301.
132. Levine DA, Bogomolny F, Yee CJ, et al. Frequent mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancers. *Clin Cancer Res*. 2005 Apr 15;11(8):2875-8. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-2142. PMID: 15837735.
133. Ikenoue T, Kanai F, Hikiba Y, et al. Functional analysis of PIK3CA gene mutations in human colorectal cancer. *Cancer Res*. 2005 Jun 1;65(11):4562-7. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-4114. PMID: 15930273.
134. Zhao L, Vogt PK. Helical domain and kinase domain mutations in p110alpha of phosphatidylinositol 3-kinase induce gain of function by different mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Feb 19;105(7):2652-7. doi: 10.1073/pnas.0712169105. Epub 2008 Feb 11. PMID: 18268322; PMCID: PMC2268191.
135. Croessmann S, Sheehan JH, Lee KM, et al. *PIK3CA* C2 Domain Deletions Hyperactivate Phosphoinositide 3-kinase (PI3K), Generate Oncogene Dependence, and Are Exquisitely Sensitive to PI3K α Inhibitors. *Clin Cancer Res*. 2018 Mar 15;24(6):1426-1435. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-2141. Epub 2017 Dec 28. Erratum in: *Clin Cancer Res*. 2019 Feb 15;25(4):1432. PMID: 29284706; PMCID: PMC5856622.
136. Chakravarty D, Gao J, Phillips SM, et al. OncoKB: A Precision Oncology Knowledge Base. *JCO Precis Oncol*. 2017 Jul;2017:PO.17.00011. doi: 10.1200/PO.17.00011. Epub 2017 May 16. PMID: 28890946; PMCID: PMC5586540.
137. Mishra R, Patel H, Alanazi S, et al. PI3K Inhibitors in Cancer: Clinical Implications and Adverse Effects. *Int J Mol Sci*. 2021 Mar 27;22(7):3464. doi: 10.3390/ijms22073464. PMID: 33801659; PMCID: PMC8037248.
138. Andre, F. Ciruelos, E.M. et al. Alpelisib (ALP) + fulvestrant (FUL) for advanced breast cancer (ABC): Results of the Phase 3 SOLAR-1 trial. *Oncol. PRO EMSO 2018*, 29.
139. André F, Ciruelos E, Rubovszky G, et al. SOLAR-1 Study Group. Alpelisib for *PIK3CA*-Mutated, Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2019 May 16;380(20):1929-1940. doi: 10.1056/NEJMoa1813904. PMID: 31091374.

140. Wen PY, Omuro A, Ahluwalia MS, et al. Phase I dose-escalation study of the PI3K/mTOR inhibitor voxtalisib (SAR245409, XL765) plus temozolomide with or without radiotherapy in patients with high-grade glioma. *Neuro Oncol.* 2015 Sep;17(9):1275-83. doi: 10.1093/neuonc/nov083. Epub 2015 May 26. PMID: 26019185; PMCID: PMC4588757.
141. Szopa W, Burley TA, Kramer-Marek G, et al. Diagnostic and Therapeutic Biomarkers in Glioblastoma: Current Status and Future Perspectives. *Biomed Res Int.* 2017;2017:8013575. doi: 10.1155/2017/8013575. Epub 2017 Feb 20. PMID: 28316990; PMCID: PMC5337853.
142. Thuy MN, Kam JK, Lee GC, et al. 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 May;22(5):785-99. doi: 10.1016/j.jocn.2014.10.029. Epub 2015 Feb 16. PMID: 25698544.
143. Shirahata M, Ono T, Stichel D, et al. Novel, improved grading system(s) for IDH-mutant astrocytic gliomas. *Acta Neuropathol.* 2018 Jul;136(1):153-166. doi: 10.1007/s00401-018-1849-4. Epub 2018 Apr 23. PMID: 29687258.
144. Appay R, Dehais C, Maurage CA, et al. POLA Network. CDKN2A homozygous deletion is a strong adverse prognosis factor in diffuse malignant IDH-mutant gliomas. *Neuro Oncol.* 2019 Dec 17;21(12):1519-1528. doi: 10.1093/neuonc/noz124. PMID: 31832685; PMCID: PMC7145561.
145. López-Ginés, C., Gil-Benso, R., Ferrer-Luna, R., et al. New pattern of egfr amplification in glioblastoma and the relationship of gene copy number with gene expression profile. *Modern Pathology*, 2010 June 23(6), 856-865. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2010.62>
146. Crespo I, Vital AL, Nieto AB, et al. Detailed characterization of alterations of chromosomes 7, 9, and 10 in glioblastomas as assessed by single-nucleotide polymorphism arrays. *J Mol Diagn.* 2011 Nov;13(6):634-47. doi: 10.1016/j.jmoldx.2011.06.003. Epub 2011 Aug 30. PMID: 21884817; PMCID: PMC3194060.
147. Houillier C, Lejeune J, Benouaich-Amiel A, et al. Prognostic impact of molecular markers in a series of 220 primary glioblastomas. *Cancer.* 2006 May 15;106(10):2218-23. doi: 10.1002/cncr.21819. PMID: 16568472.
148. Sarkaria JN, Carlson BL, Schroeder MA, et al. Use of an orthotopic xenograft model for assessing the effect of epidermal growth factor receptor amplification on glioblastoma radiation response. *Clin Cancer Res.* 2006 Apr 1;12(7 Pt 1):2264-71. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-2510. PMID: 16609043.
149. Ma S, Rudra S, Campian JL, et al. Prognostic impact of CDKN2A/B deletion, TERT mutation, and EGFR amplification on histological and molecular IDH-wildtype glioblastoma. *Neurooncol Adv.* 2020 Sep 18;2(1):vdaa126. doi: 10.1093/noajnl/vdaa126. PMID: 33235995; PMCID: PMC7668466.

150. Hsu EJ, Thomas J, Maher EA, et al.. Impact of CDKN2A/B, MTAP, and TERT Genetic Alterations on Survival in IDH Wild Type Glioblastomas. *Discov Oncol.* 2022 Nov 15;13(1):126. doi: 10.1007/s12672-022-00590-2. PMID: 36380219; PMCID: PMC9666584.
151. Agarwal P, Sandey M, DelInnocentes P, et al. Tumor suppressor gene p16/INK4A/CDKN2A-dependent regulation into and out of the cell cycle in a spontaneous canine model of breast cancer. *J Cell Biochem.* 2013 Jun;114(6):1355-63. doi: 10.1002/jcb.24476. PMID: 23238983.
152. Pawlik TM, Keyomarsi K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004 Jul 15;59(4):928-42. doi: 10.1016/j.ijrobp.2004.03.005. PMID: 15234026.
153. Olympios N, Gilard V, Marguet F, et al. *TERT* Promoter Alterations in Glioblastoma: A Systematic Review. *Cancers (Basel).* 2021 Mar 8;13(5):1147. doi: 10.3390/cancers13051147. PMID: 33800183; PMCID: PMC7962450.
154. Diplas BH, He X, Brosnan-Cashman JA, et al. The genomic landscape of TERT promoter wildtype-IDH wildtype glioblastoma. *Nat Commun.* 2018 May 25;9(1):2087. doi: 10.1038/s41467-018-04448-6. PMID: 29802247; PMCID: PMC5970234.
155. Hsu EJ, Thomas J, Maher EA, et al. Impact of CDKN2A/B, MTAP, and TERT Genetic Alterations on Survival in IDH Wild Type Glioblastomas. *Discov Oncol.* 2022 Nov 15;13(1):126. doi: 10.1007/s12672-022-00590-2. PMID: 36380219; PMCID: PMC9666584.
156. Amen AM, Fellmann C, Soczek KM, et al. Cancer-specific loss of *TERT* activation sensitizes glioblastoma to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021 Mar 30;118(13):e2008772118. doi: 10.1073/pnas.2008772118. PMID: 33758097; PMCID: PMC8020668.
157. Wesbuer S, Lanvers-Kaminsky C, Duran-Seuberth I, et al. Association of telomerase activity with radio- and chemosensitivity of neuroblastomas. *Radiat Oncol.* 2010 Jul 19;5:66. doi: 10.1186/1748-717X-5-66. PMID: 20642823; PMCID: PMC2917444.
158. Arita H, Yamasaki K, Matsushita Y, et al. A combination of TERT promoter mutation and MGMT methylation status predicts clinically relevant subgroups of newly diagnosed glioblastomas. *Acta Neuropathol Commun.* 2016 Aug 8;4(1):79. doi: 10.1186/s40478-016-0351-2. PMID: 27503138; PMCID: PMC4977715.
159. Nguyen HN, Lie A, Li T, Chowdhury R, et al. Human TERT promoter mutation enables survival advantage from MGMT promoter methylation in IDH1 wild-type primary glioblastoma treated by standard chemoradiotherapy. *Neuro Oncol.* 2017 Mar 1;19(3):394-404. doi: 10.1093/neuonc/now189. PMID: 27571882; PMCID: PMC5464302.
160. Oh JE, Ohta T, Nonoguchi N, et al. Genetic Alterations in Gliosarcoma and Giant Cell Glioblastoma. *Brain Pathol.* 2016 Jul;26(4):517-22. doi: 10.1111/bpa.12328. Epub 2015 Dec 16. PMID: 26443480; PMCID: PMC8029477.
161. Pekmezci M, Rice T, Molinaro AM, et al. Adult infiltrating gliomas with WHO 2016 integrated diagnosis: additional prognostic roles of ATRX and TERT. *Acta Neuropathol.* 2017

- Jun;133(6):1001-1016. doi: 10.1007/s00401-017-1690-1. Epub 2017 Mar 2. PMID: 28255664; PMCID: PMC5432658.
162. Shinojima N, Kochi M, Hamada J, et al. The influence of sex and the presence of giant cells on postoperative long-term survival in adult patients with supratentorial glioblastoma multiforme. *J Neurosurg.* 2004 Aug;101(2):219-26. doi: 10.3171/jns.2004.101.2.0219. PMID: 15309911.
163. Oh T, Rutkowski MJ, Safaee M, et al. Survival outcomes of giant cell glioblastoma: institutional experience in the management of 20 patients. *J Clin Neurosci.* 2014 Dec;21(12):2129-34. doi: 10.1016/j.jocn.2014.04.011. Epub 2014 Jul 16. PMID: 25037316.
164. Meyer-Puttlitz B, Hayashi Y, Waha A, et al. Molecular genetic analysis of giant cell glioblastomas. *Am J Pathol.* 1997 Sep;151(3):853-7. PMID: 9284834; PMCID: PMC1857850.
165. Martinez R, Roggendorf W, Baretton G, et al. Cytogenetic and molecular genetic analyses of giant cell glioblastoma multiforme reveal distinct profiles in giant cell and non-giant cell subpopulations. *Cancer Genet Cytogenet.* 2007 May;175(1):26-34. doi: 10.1016/j.cancergencyto.2007.01.006. PMID: 17498554.
166. Peraud A, Watanabe K, Schwechheimer K, et al. Genetic profile of the giant cell glioblastoma. *Lab Invest.* 1999 Feb;79(2):123-9. PMID: 10068201.
167. Rivlin N, Brosh R, Oren M, et al. Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis. *Genes Cancer.* 2011 Apr;2(4):466-74. doi: 10.1177/1947601911408889. PMID: 21779514; PMCID: PMC3135636.
168. Aylon Y, Oren M. p53: guardian of ploidy. *Mol Oncol.* 2011 Aug;5(4):315-23. doi: 10.1016/j.molonc.2011.07.007. Epub 2011 Jul 30. PMID: 21852209; PMCID: PMC3164924.
169. Eischen CM. Genome Stability Requires p53. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016 Jun 1;6(6):a026096. doi: 10.1101/cshperspect.a026096. PMID: 27252396; PMCID: PMC4888814.
170. Mukherjee J, Johannessen TC, Ohba S, et al. Mutant IDH1 Cooperates with ATRX Loss to Drive the Alternative Lengthening of Telomere Phenotype in Glioma. *Cancer Res.* 2018 Jun 1;78(11):2966-2977. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-2269. Epub 2018 Mar 15. PMID: 29545335.
171. Shi ZF, Li KK, Kwan JSH, et al. Whole-exome sequencing revealed mutational profiles of giant cell glioblastomas. *Brain Pathol.* 2019 Nov;29(6):782-792. doi: 10.1111/bpa.12720. Epub 2019 Apr 10. PMID: 30861589; PMCID: PMC8028679.
172. Erson-Omay EZ, Çağlayan AO, et al. Somatic POLE mutations cause an ultramutated giant cell high-grade glioma subtype with better prognosis. *Neuro Oncol.* 2015 Oct;17(10):1356-64. doi: 10.1093/neuonc/nov027. Epub 2015 Mar 3. PMID: 25740784; PMCID: PMC4578578.

173. Bouffet E, Larouche V, Campbell BB, et al. Immune Checkpoint Inhibition for Hypermutant Glioblastoma Multiforme Resulting From Germline Biallelic Mismatch Repair Deficiency. *J Clin Oncol*. 2016 Jul 1;34(19):2206-11. doi: 10.1200/JCO.2016.66.6552. Epub 2016 Mar 21. PMID: 27001570.
174. Johanns TM, Miller CA, Dorward IG, et al. Immunogenomics of Hypermutated Glioblastoma: A Patient with Germline POLE Deficiency Treated with Checkpoint Blockade Immunotherapy. *Cancer Discov*. 2016 Nov;6(11):1230-1236. doi: 10.1158/2159-8290.CD-16-0575. Epub 2016 Sep 28. PMID: 27683556; PMCID: PMC5140283.
175. Barresi, V., Simbolo, M., Mafficini, A. et al. IDH-wild type glioblastomas featuring at least 30% giant cells are characterized by frequent RB1 and NF1 alterations and hypermutation. *acta neuropathol commun* 9, 200 (2021). <https://doi.org/10.1186/s40478-021-01304-5>

ANEXOS ARTICULOS

Molecular Study of Long-Term Survivors of Glioblastoma by Gene-Targeted Next-Generation Sequencing

Diana Cantero, BSc, Ángel Rodríguez de Lope, MD, PhD, Raquel Moreno de la Presa, MD, Juan M. Sepúlveda, MD, PhD, José M. Borrás, MD, PhD, Javier S. Castresana, MD, PhD, Nicky D'Haene, MD, PhD, Juan F. García, MD, PhD, Isabelle Salmon, MD, PhD, Manuela Mollejo, MD, PhD, Juan A. Rey, PhD, Aurelio Hernández-Lain, MD, PhD, and Bárbara Meléndez, PhD

Abstract

Glioblastoma (GBM) is the most common malignant adult primary brain tumor. Despite its high lethality, a small proportion of patients have a relatively long overall survival (OS). Here we report a study of a series of 74 GBM samples from 29 long-term survivors (LTS) OS ≥ 36 months and 45 non-LTS. Using next-generation sequencing, we analyzed genetic alterations in the genes most frequently altered in gliomas. Approximately 20% of LTS had a mutation in the *IDH1* or *IDH2* (*IDH*) genes, denoting the relevance of this molecular prognostic factor. A new molecular group of GBMs harbored alterations in *ATRX* or *DAXX* genes in the absence of driver *IDH* or *H3F3A* mutations. These patients tended to have a slightly better prognosis, to be younger at diagnosis, and to present frontal or temporal tumors, and, morphologically, to present giant tumor cells. A significant fraction of LTS GBM patients had tumors with 1 or more alterations in the relevant GBM signaling pathways (RTK/PI3K, TP53 and RB1). In these patients, the *PDGFRA* alteration is suggested to be a favorable molecular factor. Our findings here are relevant for developing future

targeted therapies and for identifying molecular prognostic factors in GBM patients.

Key Words: Glioblastoma, Long-term survival, Next-generation sequencing.

INTRODUCTION

Glioblastoma (GBM) is the most common and malignant primary brain tumor in adults and, despite improvements in therapeutic options, it remains one of the deadliest cancers. Even with aggressive surgical resection, radiotherapy and chemotherapy, the median survival is only approximately 16 months from the time of diagnosis. Nevertheless, despite the poor prognosis, 2%–8% of the patients survive for >2 years, and a smaller fraction still survive beyond 3 or even 5 years (1, 2). These patients are arbitrarily referred to as long-term survivors (LTS).

The recent 2016 review of the CNS WHO classification criteria includes “integrated” histological and relevant molecular parameters that have a strong impact on the diagnosis and classification of gliomas, as well as on their prognosis (3). Mutations of *IDH1* or *IDH2* (*IDH*) genes are associated with a more favorable outcome in GBMs, being more common in younger patients and in those with secondary GBM (4, 5).

The molecular genomic and transcriptomic landscapes of GBMs and lower-grade gliomas have recently been reported (6–9), but little attempt has been made to identify the clinical and molecular parameters underlying LTS in GBM, even though this could be crucial for individual therapies. Our aim was to apply next-generation sequencing (NGS) approaches to detect targeted mutations and copy number variation (CNV) in LTS and non-LTS of GBM in order to identify the molecular characteristics underpinning long-term survival.

MATERIALS AND METHODS

Patients and Tissue Samples

Twenty-nine patients with an overall survival (OS) longer than 36 months (LTS > 36) diagnosed with GBM between

From Department of Pathology (Neuropathology) (DC, AH-L); and Department of Medical Oncology (JMS), 12 de Octubre University Hospital, Madrid, Spain; Department of Neurosurgery (ARL); Department of Radiology (RMP); and Department of Pathology (MM, BM), Virgen de la Salud Hospital, Toledo, Spain; Department of Neurosurgery (JMB), Ciudad Real University Hospital, Ciudad Real, Spain; Department of Biochemistry and Genetics (JSC), University of Navarra School of Sciences, Pamplona, Spain; Department of Pathology (ND'H, IS), Erasme Hospital, Université Libre de Bruxelles (ULB), Brussels, Belgium; Department of Pathology (JFG), MD Anderson Cancer Center, Madrid, Spain; IdiPaz Research Unit (JAR), La Paz University Hospital, Madrid, Spain. Send correspondence to: Bárbara Meléndez, PhD, Department of Pathology, Virgen de la Salud Hospital, Avda. Barber 30, Toledo 45004, Spain; E-mail: bmelendez@sescam.jccm.es

This work was supported by grants PI13/00800 and PI13/01258 from the Fondo de Investigaciones Sanitarias of the Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación, cofunded by the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER 2007-2013) “Unión Europea” “Una manera de hacer Europa.”

The authors have no duality or conflicts of interest to declare.

Supplementary Data can be found at <http://www.jnen.oxfordjournals.org>.

TP53, ATRX alterations, and low tumor mutation load feature IDH-wildtype giant cell glioblastoma despite exceptional ultra-mutated tumors

Diana Cantero, Manuela Mollejo, Juan M. Sepúlveda, Nicky D'Haene, Myriam J. Gutiérrez-Guamán, Angel Rodríguez de Lope, Concepción Fiaño, Javier S. Castresana, Laetitia Lebrun, Juan A. Rey, Isabelle Salmon, Bárbara Meléndez[†] and Aurelio Hernández-Lain[†]

Department of Pathology (Neuropathology) and Instituto de Investigación i+12, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain (D.C., M.J.G.-G., A.H.-L.); Department of Pathology, Virgen de la Salud Hospital, Toledo, Spain (M.M., B.M.); Department of Medical Oncology, University Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain (J.M.S.); Department of Pathology, Erasme Hospital, Université Libre de Bruxelles (ULB), Brussels, Belgium (N.D., L.L., I.S., B.M.); Department of Neurosurgery, Virgen de la Salud Hospital, Toledo, Spain (A.R.L.); Department of Pathology, Alvaro Cunqueiro Hospital, Vigo, Spain (C.F.); Department of Biochemistry and Genetics, University of Navarra School of Sciences, Pamplona, Spain (J.S.C.); IdiPaz Research Unit, La Paz University Hospital, Madrid, Spain (J.A.R.)

[†]These authors contributed equally to this work.

Corresponding Authors: Aurelio Hernández-Lain, MD, PhD, Department of Pathology (Neuropathology) and Instituto de Investigación i+12, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid 28041, Spain (aurelio.hlain@salud.madrid.org); Bárbara Meléndez, PhD, Department of Pathology, Virgen de la Salud Hospital, Toledo 45004, Spain (bmelendez@sescam.jccm.es); Department of Pathology, Erasme Hospital, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium (barbara.MelendezAsensio@erasme.ulb.ac.be).

Abstract

Background. Giant cell glioblastoma (gcGBM) is a rare morphological variant of IDH-wildtype (IDHwt) GBM that occurs in young adults and have a slightly better prognosis than "classic" IDHwt GBM.

Methods. We studied 36 GBMs, 14 with a histopathological diagnosis of gcGBM and 22 with a giant cell component. We analyzed the genetic profile of the most frequently mutated genes in gliomas and assessed the tumor mutation load (TML) by gene-targeted next-generation sequencing. We validated our findings using The Cancer Genome Atlas (TCGA) data.

Results. p53 was altered by gene mutation or protein overexpression in all cases, while driver *IDH1*, *IDH2*, *BRAF*, or *H3F3A* mutations were infrequent or absent. Compared to IDHwt GBMs, gcGBMs had a significant higher frequency of *TP53*, *ATRX*, *RB1*, and *NF1* mutations, while lower frequency of *EGFR* amplification, *CDKN2A* deletion, and *TERT* promoter mutation. Almost all tumors had low TML values. The high TML observed in only 2 tumors was consistent with *POLE* and *MSH2* mutations. In the histopathological review of TCGA IDHwt, *TP53*-mutant tumors identified giant cells in 37% of the cases. Considering our series and that of the TCGA, patients with *TP53*-mutant gcGBMs had better overall survival than those with *TP53*wt GBMs (log-rank test, $P < .002$).

Conclusions. gcGBMs have molecular features that contrast to "classic" IDHwt GBMs: unusually frequent *ATRX* mutations and few *EGFR* amplifications and *CDKN2A* deletions, especially in tumors with a high number of giant cells. TML is frequently low, although exceptional high TML suggests a potential for immune checkpoint therapy in some cases, which may be relevant for personalized medicine.

Key Points

- IDHwt gcGBMs are *TP53*mut with unusually frequent *ATRX* mutations and few *EGFR* amplifications and *CDKN2A* deletions.
- *TP53* alteration could be a driver event in gcGBM.
- Most gcGBMs had low TML. Immune checkpoint therapy could be potentially used in exceptional high TML cases.

© The Author(s) 2020. Published by Oxford University Press, the Society for Neuro-Oncology and the European Association of Neuro-Oncology. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

