

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Inmunoterapia en gliomas: alteraciones epigenéticas,
caracterización de potenciales dianas terapéuticas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Cruz Martín Soberón

Directores

Juan Manuel Sepúlveda Sánchez
Pilar Sánchez Gómez
Ricardo Gargini

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL:

INMUNOTERAPIA EN GLIOMAS: ALTERACIONES EPIGENÉTICAS,
CARACTERIZACIÓN DE POTENCIALES DIANAS TERAPÉUTICAS

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR:

María Cruz Martín Soberón

DIRECTORES:

Dr. Juan Manuel Sepúlveda Sánchez

Dra. Pilar Sánchez Gómez

Dr. Ricardo Gargini

A María Cruz y Jose Antonio, mis padres.

AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo ha sido posible gracias al esfuerzo conjunto de muchos profesionales a los que estaré eternamente agradecida por su apoyo y acompañamiento durante todo este tiempo.

En primer lugar, tengo que agradecer el trabajo y esfuerzo del Dr. Juan Manuel Sepúlveda, director de esta tesis. En agradecimiento por impulsarme y motivarme a iniciar el doctorado y por enseñarme neurooncología tanto a nivel de investigación como de práctica clínica. En medicina resulta necesario aprender de la mano de nuestros compañeros y en estos años yo he podido aprender mucho de él, eso me lo llevo para siempre, muchas gracias. Mi agradecimiento también a mis dos directores la Dra. Pilar Sánchez y el Dr. Ricardo Gargini, investigadores del Instituto de Salud Carlos III, por ayudarme con el enfoque básico que tanto cuesta al principio del trabajo y por hacer posible que el proyecto tomara forma poco a poco, sin ellos no habría sido posible.

A todos los profesionales que forman parte del Comité de Neurooncología del Hospital 12 de Octubre, gracias por hacer que el concepto “enfoque multidisciplinar” se desarrolle al máximo exponente y permita a nuestros pacientes una atención individualizada y de calidad. A los Servicios de Anatomía Patológica, Oncología Radioterápica, Neurocirugía y Radiología por enseñarme tanto en cada sesión, estar siempre dispuestos a “revisar un caso” y dejarme aprender de ellos. En agradecimiento a su dedicación a los pacientes afectados de tumores cerebrales.

Al Dr. Luís Paz-Ares, mi agradecimiento por darme la oportunidad de estar aquí el tiempo necesario para desarrollar esta tesis y por inspirar y motivar a los oncólogos más jóvenes en labores académicas y de investigación.

En conjunto quisiera dar las gracias a todo el Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario 12 de Octubre, adjuntos y residentes, de los que aprendo cada día, gracias por ser un equipo, pero en especial a mis compañeros de la Unidad de Tumores Genitourinarios y Neurooncología por sumar tanto en mi día a día, y por acogerme a mi llegada al equipo hace ya 3 años.

A Lucía, Eli, Paula y Luis en agradecimiento por hacerme sentir una más desde el momento en el que vine a rotar en 2017 cuando aún era residente. Sois grandes profesionales y vuestros logros siempre me harán feliz.

No puedo dejar de mencionar a toda la gente que, aun sin formar parte del ámbito profesional, me animó y apoyó durante todo este tiempo. A mis padres y mi hermana, que me han empujado siempre en todos mis inicios, desde que me fui a estudiar la carrera a Barcelona y hasta la actualidad, gracias, por estar siempre y por trasmitirme la confianza que sé que tenéis en mí, sin vosotros no lo habría conseguido. A mi tía Tita y mi abuela Visi ejemplos cercanos de esfuerzo y trabajo que he tenido presentes desde mi niñez. A mi ahijada Julia, en agradecimiento por su “alegría contagiosa” y a mi cuñado Tico por convertirme en tía. A mis amigos, los de toda la vida, los de la facultad y los más recientes que me he ido encontrando en esta última etapa: gracias por vuestro apoyo y por los ratos de desconexión tan necesarios. A Javier, por su cariño, su compañía y sobre todo por entenderme cuando le digo que: “tengo que estudiar”, estoy orgullosa de la decisión que tomé de venir a Madrid y de compartir mi vida con él. A su familia, que ahora también es la mía, en agradecimiento por cuidarme y acogerme.

A nuestros pacientes y sus familiares, sin los cuales este trabajo no habría sido posible y carecería de sentido. Sois el motor de cada idea, cada proyecto y cada día de trabajo en nuestra profesión. Muchas gracias.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN / SUMMARY

1	INTRODUCCIÓN	3
1.1	Generalidades Histológicas del Sistema Nervioso Central y los gliomas	3
1.2	Clasificación	5
1.3	Diagnóstico y tratamiento.....	11
1.4	Inmunoterapia en el tratamiento del cáncer.....	14
1.5	La respuesta inmune: generalidades	17
1.6	El ambiente inmunosupresor en gliomas.....	18
1.7	Carga Mutacional Tumoral: concepto e implicación en gliomas	24
1.8	Epigenética: potenciales vías accionables para el desarrollo de terapias futuras	29
2	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	37
2.1	Hipótesis	37
2.2	Objetivos.....	37
3	PACIENTES Y MÉTODOS	41
3.1	Selección de pacientes	41
3.2	Recogida de datos.....	41
3.3	Métodos	42
3.3.1	Análisis por citometría de Flujo	42
3.3.2	Western Blot.....	44
3.3.3	Inmunohistoquímica (IHQ)	45
3.3.4	Cuantificación- IHQ.....	45
3.3.5	qRT-PCR.....	46
3.3.6	Análisis estadístico.....	46
3.3.7	Recogida de datos para el análisis de poblaciones inmunes en sangre	47
4	RESULTADOS	51

4.1	Características de los pacientes	51
4.2	Identificación de diferentes subgrupos de gliomas según el perfil inmune.....	55
4.3	Expresión de PD-L1 en las células inmunes de los distintos subgrupos	66
4.4	Análisis de supervivencia	68
4.4.1	Análisis de supervivencia en función del grado histológico	70
4.4.2	Análisis de supervivencia en función del estado de <i>IDH</i>	72
4.4.3	Análisis de supervivencia en función de <i>IDH</i> e infiltrado inmune	74
4.4.4	Análisis de supervivencia en función del grado de resección	76
4.4.5	Análisis de supervivencia en función del estado funcional inicial.....	78
4.4.6	Análisis de supervivencia en GBM en función del género	81
4.5	Descripción de poblaciones inmunes en sangre periférica al diagnóstico.....	83
4.5.1	Celularidad inmune en sangre periférica al diagnóstico del glioma y relación con el grado histológico tumoral.....	86
4.5.2	Descripción de los grados de linfopenia en los GBM: relación con el estado de <i>IDH</i> y con el infiltrado inmune tumoral alto vs. bajo (hi vs. lo).....	89
4.5.3	Descripción de recuento de linfocitos en GBM en función del género	91
5	DISCUSIÓN	955
6	CONCLUSIONES.....	1033
7	MATERIAL SUPLEMENTARIO	1077
7.1	Base de datos	1077
8	BIBLIOGRAFÍA.....	1111

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los tumores de SNC (OMS 2016)	6
Tabla 2. Anticuerpos específicos para el análisis por citometría.	43
Tabla 3. Tratamiento postquirúrgico estándar para los distintos gliomas en función de histología y grado tumoral.	52
Tabla 4. Características de los pacientes incluidos.	53
Tabla 5. Características clínico-patológicas de la población a estudio.	54
Tabla 6. Diferencias en la composición del infiltrado inmune en gliomas <i>IDH</i> mutados (LGG y GBM), GBMw/t_lo y GBMw/t_hi.	66
Tabla 7. Karnofsky Performance Status Scale (KPS).	79
Tabla 8. Grados de linfopenia y neutropenia de acuerdo con CTCAE versión 5.0.	86
Tabla 9. Valores de media, la mediana y el rango intercuartílico para los distintos tipos celulares en función del infiltrado inmune tumoral (lo vs. hi).	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de inmunosupresión en el ambiente tumoral inducidos por la vía PD-1/PD-L1.	16
Figura 2. Mecanismos de TAM para inhibir las funciones de las células T y promover el crecimiento tumoral en GBM.	21
Figura 3. Células mieloides en el MT de los gliomas.	22
Figura 4. Células no inmunes del MT en gliomas.	24
Figura 5. Cebado y activación de las células T en respuesta a un epítipo antigénico específico.	25
Figura 6. Prevalencia de mutaciones somáticas en distintos tumores.	27
Figura 7. Cuatro grupos definidos por biomarcadores (TMB y GEP).	28
Figura 8. Relación entre TMB y GEP en distintos tumores incluidos en TCGA.	29
Figura 9. Esquema de un nucleosoma: ADN bicatenario rodeando el octámero de histonas. .	30
Figura 10. Alteraciones en las enzimas y metabolitos del Ciclo de Krebs asociadas con la carcinogénesis.	32
Figura 11. Ejemplo representativo del esquema de separación mediante portales de las distintas poblaciones inmunes analizadas sobre la suspensión de células obtenidas de los distintos gliomas.	44

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Caracterización del infiltrado inmune por citometría de flujo.	55
Gráfico 2. Porcentaje de poblaciones linfoides o CD11b+ CD45hi sobre la suspensión total del tumor en muestras individuales.	56
Gráfico 3. Porcentaje de células linfoides y mieloides en la suspensión tumoral total para los distintos subgrupos de gliomas.....	57
Gráfico 4. Composición del infiltrado en las suspensiones tumorales totales de los tres subgrupos.....	58
Gráfico 5. Porcentaje de células mieloides CD206+.....	59
Gráfico 6. Análisis de la microglía en la suspensión tumoral.	60
Gráfico 7. Estudio de la cantidad de células positivas para IBA1.	61
Gráfico 8. Análisis de la expresión de CD11b e IBA1.	62
Gráfico 9. Caracterización del componente linfoide en los subgrupos.....	63
Gráfico 10. Caracterización del componente linfoide en los subgrupos.....	64
Gráfico 11. Análisis de células PD1+ y Tregs.	65
Gráfico 12. Expresión de PD-L1.....	67
Gráfico 13. Cuantificación de PD-L1 en los distintos subgrupos.	68
Gráfico 14. SG de todos los pacientes incluidos.	69
Gráfico 15. SLP de todos los pacientes incluidos.	70
Gráfico 16. SG en función del grado histológico del tumor.	71
Gráfico 17. SLP en función del grado histológico del tumor.....	72
Gráfico 18. SG en función del estado de <i>IDH</i>	73
Gráfico 19. SLP en función del estado de <i>IDH</i>	74
Gráfico 20. SG en función del estado de <i>IDH</i> y el infiltrado inmune tumoral (WTlo vs. WThi).	75
Gráfico 21. SLP en función del estado de <i>IDH</i> y el infiltrado inmune tumoral (WTlo vs. WThi).	76
Gráfico 22. SG en función del grado de resección quirúrgica.	77
Gráfico 23. SLP en función del grado de resección quirúrgica.	78
Gráfico 24. SG en función del estado funcional tras la cirugía según KPS.....	80
Gráfico 25. SLP en función del estado funcional tras la cirugía según KPS.	81
Gráfico 26. SG en función del género del paciente.....	82
Gráfico 27. SLP en función del género del paciente.....	83
Gráfico 28. Leucocitos precirugía.	87
Gráfico 29. Neutrófilos precirugía.	87

Gráfico 30. Linfocitos precirugía.	87
Gráfico 31. Monocitos precirugía.	87
Gráfico 32. Leucocitos en función de grado.	88
Gráfico 33. Neutrófilos en función de grado.....	88
Gráfico 34. Linfocitos en función del grado.	88
Gráfico 35. Monocitos en función del grado.....	88
Gráfico 36. Linfocitos precirugía en GBM <i>IDH</i> mutado y GBM <i>IDH</i> w/t.....	90
Gráfico 37. Linfocitos precirugía en GBM <i>IDH</i> mutado, GBM WTlo y GBM WThi.	91
Gráfico 38. Linfocitos precirugía en función del género del paciente.	92

ABREVIATURAS

Nota: no se ha evitado el uso de terminología científica de uso común en inglés incluso entre hispanoparlantes debido a que dificultaría la comprensión.

µg: Microgramo.

µm: Micrómetro.

2-HG: 2-hidroxiglutarato.

ACGT: Adenina, citosina, guanina, timina (subunidades de nucleótidos de ADN).

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ALK: *Anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase.*

Anti-VEGF: Inhibidor del factor de crecimiento del endotelio vascular.

APC: Célula presentadora de antígenos.

ARN: Ácido ribonucleico.

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

BET: Bromodomain Extra- Terminal.

BHE: Barrera hematoencefálica.

BMDM: *Bone marrow-derived macrophages/monocytes.*

BRAF: *B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase.*

CCNU: Lomustina.

CIMP: *CpG island methylator phenotype.*

cm: Centímetros.

CNS: Central Nervous System.

CR: *Complete response.*

CTCAE: Common Terminology Criteria for Adverse Events.

CTLA-4: Cytotoxic T Lymphocyte antigen-4.

DAB: Diaminobencidina.

Dx: Diagnóstico.

ECL: Sustrato quimioluminiscente para detección por Western Blot.

EE.UU: Estados Unidos.

EGFR: *Epidermal growth factor receptor.*

EMA: *European Medicament Agency.*

EtOH: Etanol.

ES: Error estándar.

F/U: *Follow Up.*

FACS: *Fluorescence-Activated Cell Sorting.*

FasL: *FAS ligand.*

FBS: *Fetal Bovine serum.*

FDA: *Food and Drug Administration.*

GAPDH: *Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.*

GBM: *Glioblastoma.*

GEINO: *Grupo Español de Investigación en Neurooncología.*

GEP: *Perfil de expresión génica.*

gMDSCs: *Granulocytic myeloid derived suppressor cells.*

GSC: *Glioma stem cell.*

H3-K27M: *Mutación K27M en la histona H3.*

HER2: *Human Epidermal growth factor receptor 2.*

hi: *High infiltrate.*

HLA-G: *Antígeno HLA de clase 1 del sistema de histocompatibilidad.*

HRP: *Peroxidasa de rábano.*

IBA1: *Ionized Calcium Binding Adapter Protein 1.*

IC: *Intervalo de confianza.*

IDH1/2: *Isocitrato deshidrogenasa 1-2.*

IGF: *Insulin Growth Factor.*

IHQ: *Inmunohistoquímica.*

IL: *Interleuquinas.*

IV: *Intravenoso.*

KPS: *Karnofsky Performance Status.*

LGG: *Low grade glioma* (evitamos la abreviatura en castellano GBG por la similitud con GBM).

LIN: *Límite inferior normal.*

Lo: *Low infiltrate.*

M1: *Macrófagos proinflamatorios.*

M2: *Macrófagos alternativamente activados, macrófagos antiinflamatorios.*

MDSC: *Myeloid derived suppressor cells.*

MGMT: *Metil-guanina-O6-DNA metiltransferasa.*

MHC: *Major histocompatibility complex.*

mM: Milimolar.

mMDSCs: *Monocytic myeloid derived suppressor cells.*

MSI: *Microsatellite instability.*

MT: Microambiente tumoral.

n.s: No significativo.

NaCl: Cloruro de sodio.

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido reducido.

NCI: *National Cancer Institute.*

NF1: Neurofibromatosis tipo 1.

NK: *Natural killer.*

NLGN3: Neuroligina-3.

NOS: *“Not otherwise specified”.*

NT: *normal tissue.*

° C: grados centígrados.

ODG: Oligodendroglioma.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

OS: *Overall survival.*

PBS: *Phosphate Buffered Saline* (Solución Salina Amortiguada por Fosfatos).

PCR: *Polymerase chain reaction.*

PCV: Procarbina, lomustina y vincristina.

PD: *Progression disease.*

PD-1: *Programmed cell death.*

PD-L1: *Programmed death ligand-1.*

PD-L2: *Programmed death ligand-2.*

PFS: *Progression free survival.*

PI3K: Fosfoinositol 3-quinasa.

PR: *Partial response.*

PTEN: Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa.

qRT-PCR: *Reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction.*

RB: Retinoblastoma.

RMN: Resonancia magnética nuclear.

RT: Radioterapia.

SDS: *Sodium dodecyl sulfate.*

SDS-PAGE: *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.*

SG: Supervivencia global.

SI: Sistema inmunitario.

SLP: Supervivencia libre de progresión.

SNC: Sistema nervioso central.

SP: Sangre periférica.

TA: Temperatura ambiente.

TAC: Tomografía axial computerizada.

TAM: *Tumor associated macrophages.*

TBS-T: Solución salina tamponada con Tris y ácido clorhídrico.

TCA ciclo: Ciclo del ácido tricarboxílico o ciclo de Krebs.

TCA ciclo: Ciclo del Ácido Tricarboxílico o Ciclo de Krebs.

TCGA: *The Cancer Genome Atlas Program.*

TCR: Receptor de las células T.

TERT: *Telomerase reverse transcription.*

TGF-beta: Factor de crecimiento transformante beta.

Th1: linfocitos T *helper 1.*

TILs: *Tumor- infiltrating lymphocytes.*

TM: *Tumor microenvironment.*

TMB: *Tumor mutational burden.*

TMZ: Temozolomida.

Tregs: Linfocitos T reguladores.

UN: *Unknown.*

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor.

VO: Vía oral.

vs.: Versus.

w/t: *Wild type.*

WHO: *World Health Organization.*

Wlo: w/t con bajo infiltrado.

WThi: w/t con alto infiltrado.

RESUMEN

En la población adulta los gliomas son tumores poco frecuentes en comparación con otros primarios como los tumores de colon, mama o pulmón. Dentro de los gliomas, el glioblastoma (GBM), el grado IV, es el más frecuente y en la actualidad carece de tratamientos curativos caracterizándose por un mal pronóstico vital. Por ello es necesario desarrollar nuevos tratamientos que mejoren la evolución de estos pacientes. Respecto al resto de los gliomas, el pronóstico es mejor pero los tratamientos se basan en la radioterapia y la quimioterapia clásicas, sin cambios recientes.

En los últimos años la inmunoterapia se ha desarrollado como línea terapéutica eficaz en el cáncer de pulmón, melanoma y cáncer renal entre otros. La activación de las células inmunes (linfocitos T) contra las células tumorales ha mostrado en muchas neoplasias respuestas tumorales mantenidas. Esto ha llevado a la aprobación de distintos fármacos inhibidores del punto de control inmune (anti-PD-1, anti-PD-L1, anti-CTLA-4). Hasta el momento estos fármacos se han probado en diferentes ensayos clínicos en pacientes con GBM sin observarse las respuestas esperadas. Por ello resulta necesario entender mejor la regulación de la respuesta inmune y su posible asociación con las alteraciones moleculares más frecuentes en los gliomas. La finalidad de lo anterior es la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas o, al menos, moléculas predictoras de respuesta a inmunoterapia que puedan, a futuro, dirigir las decisiones terapéuticas. Un mayor conocimiento de la celularidad tumoral y del infiltrado inmune puede aportar información de gran interés en un tumor huérfano en avances terapéuticos en los últimos años.

La hipótesis del presente trabajo es que las alteraciones moleculares en las células de glioma podrían generar escenarios inmunológicos diferentes. Esto podría suponer diferencias en la respuesta a fármacos inhibidores del punto de control inmune, u otras inmunoterapias, según el grado y tipo de alteración. Relacionar la implicación de estos cambios moleculares con las características del infiltrado inmune tumoral podría aclarar aspectos acerca de las peculiaridades del microambiente en gliomas. Con esta hipótesis pretendemos conocer la influencia de las mutaciones y alteraciones genéticas más frecuentes en las células de glioma de distintos grados, sobre el microambiente tumoral (MT). Para ello se realizó un estudio prospectivo a partir de la inclusión de 29 pacientes adultos diagnosticados y operados de gliomas de distintos grados en nuestro centro con y sin mutación en *Isocitrato Deshidrogenasa*

(*IDH*). La muestra tumoral se obtuvo a partir de la cirugía de resección inicial. El diagnóstico histológico se realizó siguiendo la clasificación de tumores de Sistema Nervioso Central (SNC) de la Organización Mundial de la Salud (OMS) 2016 que era la que regía en el momento de desarrollo del estudio. Se obtuvo también una muestra de sangre periférica para el estudio de la celularidad inmune previo a cirugía de resección tumoral. Se elaboró una base de datos para su posterior análisis recogiendo las variables clínicas, histológicas, moleculares y radiológicas necesarias. Se llevó a cabo la caracterización del infiltrado inmune asociado a tumor por citometría de flujo y se estudió la correlación de esta información con el perfil genético-molecular y el análisis histológico de cada tejido.

Los objetivos del trabajo fueron: 1) conocer la diferente evolución clínica de los gliomas en función del estado de *IDH* así como las características del MT que envuelve a las células tumorales, 2) definir subgrupos específicos atendiendo a las diferencias de las células inflamatorias del MT, 3) caracterizar cuantitativa y cualitativamente las células inflamatorias presentes en muestras de pacientes recién diagnosticados de glioma de distintos grados y relacionarlo con el perfil molecular en función del estado de *IDH*, 4) estudiar la expresión de PD-L1, molécula clave en el control inmune tumoral, en las células tumorales de gliomas de distintos grados así como en las células mieloides del infiltrado que las rodea, 5) describir las poblaciones inmunes en sangre periférica al diagnóstico del glioma y analizar la relación con el infiltrado tumoral y factores clínicos y moleculares que pudieran apoyar su utilidad como marcadores pronóstico.

De los 29 pacientes incluidos: 9 fueron diagnosticados de un glioma de bajo grado ("*lower grade glioma*": LGG) (3 oligodendrogliomas grado II y 6 astrocitomas grado III) y 20 fueron diagnosticados de GBM (grado IV). La mayoría de LGG eran *IDH* mutados (7 de 9) mientras que 3 de los 20 GBM presentaban mutación en *IDH*. Se recogió el material de un total de 29 pacientes. Hubo 4 fallos de screening. El material de las 29 muestras se caracterizó por citometría de flujo. Se llevó a cabo un análisis más completo del infiltrado en 26 pacientes, para este análisis se descartaron 3 muestras por escasez de celularidad y por la baja calidad de la muestra tumoral. El estudio de la población inmune en el microambiente mostró que los tumores *IDH* mutados presentaban un infiltrado inmune escaso tanto en el componente linfoide como mieloides respecto a los *IDH* no mutados (en adelante w/t). Independientemente del grado tumoral, los *IDH* mutados contienen menos células inmunes y los GBM *IDH* mutados se asemejan en el infiltrado linfoide y mieloides a los tumores de bajo grado y no a al resto de

GBMs. Se establecieron 3 grupos de pacientes según el infiltrado inmune y el status de *IDH*: *IDH* mutado, *IDHwt* con bajo infiltrado inflamatorio (*IDHwt_lo*) e *IDHwt* con elevado infiltrado inflamatorio (*IDHwt_hi*). El análisis de supervivencia mostró mejor supervivencia global (SG) y supervivencia libre de progresión (SLP) en los pacientes con mutación de *IDH*, lo cual concuerda con la información de la que disponemos hasta la fecha acerca del mejor pronóstico de los tumores *IDH1/2* mutados. Atendiendo al estado de *IDH* + infiltrado inmune (*lo* vs. *hi*) la SG fue discretamente superior en los pacientes con tumores WThi respecto a los WTlo, no siendo los resultados estadísticamente significativos. Se analizó también la influencia en términos de supervivencia de parámetros tales como el grado de resección tumoral o el estado global del paciente tras la cirugía. Se realizó un análisis descriptivo de las poblaciones linfoides y mieloides en sangre periférica al diagnóstico del glioma en los 29 pacientes incluidos.

En conclusión, el presente trabajo ahonda en el conocimiento del MT de los gliomas e identifica diferencias en la celularidad inmune en función del grado histológico y el perfil molecular. Aunque estos resultados requieren validación con el estudio de series más grandes, abren la puerta a la necesidad de estudio del MT en los gliomas y a la posibilidad de que sus diferencias impulsen líneas de investigación más selectivas en el futuro. Esto resulta de interés para el desarrollo de tratamientos o moléculas predictoras de respuesta a inmunoterapia que puedan apoyar las decisiones terapéuticas en estos pacientes.

SUMMARY

In adult population, gliomas are rare tumors compared to other primary neoplasms such as colon, breast, or lung cancers. Among the gliomas, glioblastoma (GBM), grade IV, is the most frequent and currently lacks curative effective treatments, it's characterized by a poor vital prognosis. For this reason, it is necessary to develop new treatments that improve the evolution of these patients. Regarding to the rest of the gliomas, the prognosis is better, but therapeutic is based on classical radiotherapy and chemotherapy, with no recent advances.

Over last years, immunotherapy has been developed as an effective therapeutic approach in some tumors, as, for example, lung cancer, melanoma and kidney cancer. Activation of immune cells (T lymphocytes) against tumor has proved to maintain tumor responses in some neoplasms. This has led to different immune checkpoint inhibitor drugs approval (anti-PD-1, anti-PD-L1, anti-CTLA-4). These drugs have been tested in different GBM patients' clinical trials, but the expected results have not been seen yet. Therefore, it is necessary a better understanding of the immune response regulation and its possible association with most frequent molecular alterations in gliomas. The purpose of the above is to search for new therapeutic targets or, at least, predictive markers of immunotherapy response that may guide therapeutic decisions. A better knowledge of tumor cellularity and immune infiltrate can provide interesting information in gliomas taking into account that there have not been therapeutic advances in lasts years.

The hypothesis of the present work is based on the possible influence of molecular glioma cells alterations generating a different immunological scenario with the consequent clinical implications for these patients. This could lead to different immune checkpoint inhibitors, and other immunotherapeutic responses according to epigenetic regulation and molecular alterations. Improved knowledge about the implication of these molecular features and tumor immune infiltrate characteristics could clarify tumor microenvironment (TM) peculiarities in gliomas. With this hypothesis we want to unravel the influence of most frequent glioma cells mutations and genetic alterations in different grades glioma cells, on the tumor microenvironment (MT).

To this end, a prospective study was carried out including 29 adult patients diagnosed and surgically resected of different histological grade gliomas in our center. Glioma patients with and without *Isocitrate Dehydrogenase (IDH)* mutation were included. Tumor samples

were obtained from the initial surgical resection. Histological diagnosis was performed according to the 2016 World Health Organization (WHO) Central Nervous System (CNS) classification which was the standard at the time of developing our study. Peripheral blood sample was also obtained prior to tumor resection for the study of immune cellularity. A database was performed with clinical, histological, molecular, and radiological information for subsequent analysis. Tumor immune infiltrate was characterized by flow cytometry analysis and correlation with molecular and histological glioma tissue features was studied.

Specific objectives were: 1) to perform a quantitative and qualitative inflammatory cells characterization in samples of newly diagnosed patients with different grade glioma out TM immune infiltrate analysis based on *IDH* status; 2) to describe the differences in TM inflammatory cells according to glioma molecular features; 3) to associate inflammatory cellularity analysis results with tumor molecular profile and with patients' clinical evolution after standard treatment to carry out a survival analysis based on different clinical, histological and molecular features; 4) to describe immune populations in peripheral blood at glioma diagnosis and study the relationship with tumor immune infiltrate and different clinical and molecular features.

The study population included 29 patients: 9 were diagnosed with a lower-grade glioma (LGG) (3 grade II oligodendrogliomas and 6 grade III astrocytomas) and 20 were diagnosed with GBM grade IV. The majority of LGG were *IDH* mutated gliomas (7 out of 9), while 3 out of 20 GBM harbor *IDH* mutation. Tumor material was collected from a total of 29 patients. Samples were characterized by cytometry according to the immune infiltrate: high vs. low levels. A more complete analysis was carried out in 26 patients. For this analysis, 3 samples were discarded due to lack of cellularity and quality of the tumor sample. The analysis of immune population in TM showed a reduced immune infiltrate, in both the lymphoid and myeloid component, in mutant *IDH* gliomas comparing to *IDH* w/t. Regardless of tumor grade, mutated *IDH* gliomas contain fewer immune cells and mutated *IDH* GBM resemble low-grade tumors in lymphoid and myeloid infiltrate composition and none of the rest of GBMs.

Three groups were established: *IDH* mutated, *IDHwt_low* and *IDHwt_high*. Survival analysis showed better overall survival (OS) and progression free survival (PFS) in patientes with mutated *IDH* tumors which is consistent with the information available to date regarding the better prognosis of *IDH1/2* mutated gliomas. Regarding to *IDH* status + immune infiltrate

(low vs. high) OS was slightly higher in *IDHwt_hi* compared to *IDHwt_lo* tumors but differences were not statistically significant. The influence of parameters such as type of tumor resection or patient's global condition after surgery were also analysed. A descriptive analysis of lymphoid and myeloid populations in peripheral blood was carried out at the diagnosis of glioma in the 29 included patients.

In conclusion, this work delves into the knowledge of TM in gliomas and identifies differences in immune cellularity depending on the histological grade and the molecular profile. Although these results require validation with larger cohort, open the door to the TM study necessity in gliomas and to the possibility of more selective future lines of research according to these differences. This is of interest for the development of therapies or the predictive molecules of immunotherapy response that can support therapeutic decisions for these patients.

1. INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades Histológicas del Sistema Nervioso Central y los gliomas

El SNC comprende un conjunto de estructuras complejas encargadas del control del organismo y la coordinación de múltiples funciones. Está constituido por el encéfalo (hemisferios cerebrales, tronco del encéfalo y cerebelo) y la médula espinal que se encuentran alojados dentro de unas estructuras óseas que son el cráneo y la columna vertebral, respectivamente. Está protegido también por membranas denominadas meninges (duramadre, aracnoides y piamadre), que protegen al cerebro y a la médula espinal y entre las cuales fluye el líquido cefalorraquídeo a través de espacios anatómicos denominados ventrículos y del espacio subaracnoideo.

A nivel celular el SNC está formado por tres tipos principales de células: neuronas, células gliales y células vasculares (1):

- **Neuronas:** su función principal es procesar y comunicar la información. Para llevar a cabo esta labor cada neurona integra información a través de miles de señales sinápticas (2). Conducen señales a través del axón, una prolongación que se extiende desde el cuerpo de la neurona, y reciben información a través de las dendritas. La información transmitida entre neuronas está codificada en potenciales de acción por la neurona presináptica (2). Cabe destacar que una de las principales propiedades del tejido del SNC es la excitabilidad que posee gracias a la diferencia de concentraciones iónicas a uno y otro lado de la membrana plasmática lo que se traduce en la generación de diferencias de potencial. Los cuerpos neuronales constituyen la sustancia gris. Los tumores derivados de las células neurales son muy infrecuentes.
- **Células de la glía:** originalmente se creía que no eran más que células de apoyo para las neuronas, ahora sabemos que las células gliales desempeñan funciones críticas en el desarrollo, la homeostasis y la reparación del SNC (3). Por ejemplo, estas células proveen al axón de sustancias de adhesión celular y de factores tróficos, que sirven a la terminación nerviosa para aumentar su superficie en direcciones específicas y así ir avanzando. Estas células son de especial interés en el estudio de los tumores cerebrales primarios pues la

mayoría de los mismos derivan de las células gliales. Según sus funciones, la glía se clasifica en los siguientes tipos celulares:

- Astrocitos: conforman una red de sostén para las neuronas. Constituyen aproximadamente el 30% de las células gliales del SNC. Actualmente se reconoce el papel temprano de estas células en los procesos de formación de lesiones, así como su capacidad para facilitar el acceso de las células inmunes al SNC (4). Como se revisará más adelante, originan los gliomas, las neoplasias más agresivas y frecuentes del SNC.
- Oligodendrocitos: son las células formadoras de mielina en el SNC y son esenciales para la propagación de potenciales de acción a lo largo de los axones. Adicionalmente sirven de soporte a las neuronas produciendo factores neurotróficos (5).
- Microglía: son células mononucleares y funcionan como células inmunes del SNC. Se encuentran distribuidas por todo el tejido cerebral y participan en el mantenimiento de la homeostasis. Son los macrófagos residentes del SNC (6) y tienen capacidad fagocitaria y de soporte. Permanecen en estado quiescente hasta que activan su respuesta a partir de señales del entorno celular (citoquinas o radicales libres entre otros). Se originan en el mesodermo. En las primeras etapas del desarrollo embrionario pueblan el SNC a partir de la migración desde el saco vitelino (7) donde las células madre hematopoyéticas se convierten en macrófagos primitivos que se asentarán en el SNC en desarrollo para convertirse en microglía.
- Células endoteliales: revisten los vasos sanguíneos del SNC y del conducto de Luschka. Derivan del ectodermo neural.

En España, según datos de registros poblacionales de cáncer que abarcan a un 25% de la población adulta, se estima que los gliomas afectan a 5/100.000 habitantes cada año. Esto nos indica que se trata, al menos en los adultos, de un tumor poco frecuente siendo su incidencia mayor en hombres (8). En la población pediátrica la incidencia es mayor a la observada en adultos. De hecho, los tumores primarios de SNC son la segunda neoplasia infantil más común y representan el tumor sólido más frecuente en esta población (9). El GBM es la neoplasia

cerebral primaria más común y representa más del 50% de todos los gliomas de alto grado (la incidencia es de 3-5 casos por 100.000 habitantes/año) (8). Es ligeramente más frecuente en varones y aunque puede desarrollarse en pacientes de todas las edades, la incidencia es máxima en la sexta década de la vida (8). Como detallaremos más adelante, es el tumor primario cerebral más agresivo por su alta capacidad de infiltración así como su resistencia a los tratamientos oncológicos, con una supervivencia mediana de 14 meses a pesar de cirugía, radioterapia y terapias dirigidas (10).

La diseminación de los gliomas normalmente se encuentra limitada al SNC ya que la propagación de sus células a través de la sangre es muy rara. Los tumores cerebrales primarios, por tanto, casi nunca se extienden al resto del organismo.

Los síntomas iniciales de un tumor cerebral dependerán principalmente de la localización del mismo. Entre los más frecuentes destacan: cefalea, convulsiones y problemas motores y/o sensoriales que varían en función del área afectada por la lesión. Por la anatomía del SNC sabemos que el cerebro tiene pocas posibilidades de expandirse al estar protegido por el cráneo que constituye una estructura ósea cerrada y rígida. Por ello, cuando aparece un tumor y crece, los síntomas se presentan en general de forma rápida y brusca, aunque en algunos casos pueden cursar con sintomatología más larvada como lentitud en el pensamiento, falta de concentración o cambios en el comportamiento.

A parte de la predisposición genética asociada a algunos síndromes hereditarios (Síndrome de Lynch) y la exposición a irradiación, a día de hoy, en la gran mayoría de los pacientes con gliomas no hay factores de riesgo conocidos para su desarrollo.

1.2 Clasificación

Los gliomas son un grupo heterogéneo de tumores derivados de las células de la glía. Histológicamente los gliomas se clasifican principalmente en astrocitomas u oligodendrogliomas (ODG) teniendo en cuenta la célula glial original de la que parte la lesión. Por su grado, II y III (bajo grado, “lower grade gliomas”: LGG) y IV (glioblastomas (GBM)). El grado histológico predice el comportamiento biológico de los gliomas (10). Los LGG se caracterizan por ser lesiones gliales hipercelulares con atipia nuclear pero con actividad mitótica escasa (11). Los gliomas de alto grado, grado IV (GBM), presentan extensa actividad mitótica,

necrosis y proliferación vascular. Los primeros crecen más despacio con una supervivencia media entre 5-10 años, e incluyen a los ODG.

La nueva clasificación de tumores del SNC de la Organización Mundial de la Salud 2016 (OMS 2016) ha supuesto un avance conceptual y práctico sobre la clasificación anterior de 2007, Tabla 1 (12).

Tabla 1. Clasificación de los tumores de SNC (OMS 2016)

Melanotic schwannoma	9560/1	Osteochondroma	9210/0	Diffuse astrocytic and oligodendroglial tumours		Neuronal and mixed neuronal-glial tumours	
Neurofibroma	9540/0	Osteosarcoma	9180/3	Diffuse astrocytoma, IDH-mutant	9400/3	Dysembryoplastic neuroepithelial tumour	9413/0
Atypical neurofibroma	9540/0			Gemistocytic astrocytoma, IDH-mutant	9411/3	Gangliocytoma	9492/0
Plexiform neurofibroma	9550/0	Melanocytic tumours		Diffuse astrocytoma, IDH-wildtype	9400/3	Ganglioglioma	9505/1
Perineurioma	9571/0	Meningeal melanocytosis	8728/0	Diffuse astrocytoma, NOS	9400/3	Anaplastic ganglioglioma	9505/3
Hybrid nerve sheath tumours		Meningeal melanocytoma	8728/1			Dysplastic cerebellar gangliocytoma (Lhermitte-Duclos disease)	9493/0
Malignant peripheral nerve sheath tumour	9540/3	Meningeal melanoma	8720/3			Desmoplastic infantile astrocytoma and ganglioglioma	9412/1
Epithelioid MPNST	9540/3	Meningeal melanomatosis	8728/3			Papillary glioneuronal tumour	9509/1
MPNST with perineurial differentiation	9540/3			Anaplastic astrocytoma, IDH-mutant	9401/3	Rosette-forming glioneuronal tumour	9509/1
		Lymphomas		Anaplastic astrocytoma, IDH-wildtype	9401/3	Diffuse leptomeningeal glioneuronal tumour	
Meningiomas		Diffuse large B-cell lymphoma of the CNS	9680/3	Anaplastic astrocytoma, NOS	9401/3	Central neurocytoma	9506/1
Meningioma	9530/0	Immunodeficiency-associated CNS lymphomas				Extraventricular neurocytoma	9506/1
Meningothelial meningioma	9531/0	AIDS-related diffuse large B-cell lymphoma				Paraganglioma	8693/1
Fibrous meningioma	9532/0	EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma, NOS		Glioblastoma, IDH-wildtype	9440/3		
Transitional meningioma	9537/0	Lymphomatoid granulomatosis	9766/1	Giant cell glioblastoma	9441/3		
Pseudopapillary meningioma	9533/0	Intravascular large B-cell lymphoma	9712/3	Glioblastoma, IDH-mutant	9442/3		
Angiomatous meningioma	9534/0	Low-grade B-cell lymphomas of the CNS		Glioblastoma, NOS	9440/3		
Microcystic meningioma	9530/0	T-cell and NK/T-cell lymphomas of the CNS					
Secretory meningioma	9530/0	Anaplastic large cell lymphoma, ALK-positive	9714/3				
Lymphoplasmacyte-rich meningioma	9530/0	Anaplastic large cell lymphoma, ALK-negative	9702/3				
Metaplastic meningioma	9530/0	MALT lymphoma of the dura	9699/3				
Choroid meningioma	9538/1						
Clear cell meningioma	9538/1	Histiocytic tumours					
Atypical meningioma	9539/1	Langerhans cell histiocytosis	9751/3				
Papillary meningioma	9538/3	Erdheim-Chester disease	9750/1				
Rhabdoid meningioma	9538/3	Rosai-Dorfman disease					
Anaplastic (malignant) meningioma	9530/3	Juvenile xanthogranuloma					
		Histiocytic sarcoma	9755/3				
Mesenchymal, non-meningothelial tumours							
Solitary fibrous tumour / haemangiopericytoma**		Germ cell tumours					
Grade 1	8815/0	Germinoma	9064/3				
Grade 2	8815/1	Embryonal carcinoma	9070/3				
Grade 3	8815/3	Yolk sac tumour	9071/3				
Haemangioblastoma	9161/1	Choriocarcinoma	9100/3				
Haemangioma	9120/0	Teratoma	9080/1				
Epithelioid haemangiopericytoma	9133/3	Mature teratoma	9080/0				
Angiosarcoma	9120/3	Immature teratoma	9080/3				
Kaposi sarcoma	9140/3	Teratoma with malignant transformation	9084/3				
Ewing sarcoma / PNET	9364/3	Mixed germ cell tumour	9085/3				
Lipoma	8850/0						
Angiolipoma	8861/0	Tumours of the sellar region					
Hibernoma	8880/0	Craniopharyngioma	9350/1				
Liposarcoma	8850/3	Adamantinomatous craniopharyngioma	9351/1				
Desmoid-type fibromatosis	8821/1	Papillary craniopharyngioma	9352/1				
Myofibroblastoma	8825/0	Granular cell tumour of the sellar region	9582/0				
Inflammatory myofibroblastic tumour	8825/1	Pituitaryoma	9432/1				
Benign fibrous histiocytoma	8830/0	Spindle cell oncocytoma	8290/0				
Fibrosarcoma	8810/3						
Undifferentiated pleomorphic sarcoma / malignant fibrous histiocytoma	8802/3	Metastatic tumours					
Leiomyoma	8890/0						
Leiomyosarcoma	8890/3						
Rhabdomyoma	8900/0						
Rhabdomyosarcoma	8900/3						
Chondroma	9220/0						
Chondrosarcoma	9220/3						
Osteoma	9180/0						

Fuente: Louis DN, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary (12).

En esta clasificación se utilizan parámetros moleculares además de la histología para definir las entidades tumorales, por lo que se formula un patrón molecular de clasificación de los tumores del SNC. Quedan integrados marcadores moleculares en el diagnóstico histológico de rutina que facilitan la práctica clínica y resultan en numerosas diferencias respecto a la clasificación previa de 2007. En lo referente a gliomas, incluye la determinación de la mutación en *isocitrato deshidrogenasa 1-2 (IDH1, IDH2)* la translocación de *1p/19q* y la mutación en los genes de histona 3: *H3-K27M*. Con el uso integrado de parámetros genotípicos y fenotípicos se

añade un nivel de objetividad mayor al diagnóstico puramente histológico del que disponíamos en el pasado (3). Desde el punto de vista pronóstico, agrupa tumores que comparten marcadores similares y disminuye la variabilidad inter-observador. Entidades como el oligoastrocitoma, previamente aceptado histológicamente, aunque de diagnóstico ambiguo y difícil, es actualmente, en la mayoría de los casos y gracias a la aplicación de genotipo y fenotipo, clasificable como astrocitoma (*IDH-mutado, ATRX-mutado, 1p/19q-no codeleccionado*) u oligodendroglioma (*IDH-mutado, ATRX-no mutado y 1p/19q-codeleccionado*). En aquellos casos en los que la clasificación no sea posible OMS 2016 se refiere al oligoastrocitoma como “*Not otherwise specified*” (NOS) para una entidad que no encaja en los nuevos grupos definidos (12). Gracias al diagnóstico molecular, en la actualidad los informes de “verdaderos” oligoastrocitomas que constan de poblaciones celulares con características tanto astrocíticas como oligodendrogliales, son poco frecuentes. Se intenta evitar en la medida de lo posible el diagnóstico de oligoastrocitoma, una categoría que siempre ha sido difícil de definir y que sufría de una gran discordancia inter-observador. De esta forma los subtipos de astrocitoma y oligodendroglioma se definen de manera más homogénea.

Cabe destacar que el fenotipo histológico sigue siendo muy relevante en el diagnóstico de estos tumores. Pese a la información aportada por el perfil molecular, las determinaciones del grado tumoral siguen atendiendo a criterios histológicos (número de mitosis, presencia de necrosis, características de la vasculatura) y para algunos tumores concretos no disponemos en la actualidad de características moleculares definitorias.

La nomenclatura aceptada en la actualidad para los tumores del SNC consiste en el diagnóstico histopatológico seguido de las características moleculares. En la clasificación OMS 2016 los gliomas difusos incluyen: los astrocitomas grado II y grado III, los ODG grado II y grado III y los GBM grado IV (3). Esta agrupación deja al margen los astrocitomas con crecimiento más circunscrito, ausencia de alteraciones en *IDH* y frecuentes alteraciones en el gen *BRAF* (astrocitoma pilocítico y xantoastrocitoma pleomórfico). Dicho de otro modo: los astrocitomas y oligodendrogliomas difusos son ahora entidades nosológicamente más parecidas que los astrocitomas pilocíticos y los astrocitomas difusos. Utilizando diferentes –ómicas se han descrito vías alteradas en gliomas:

- a. la vía de los receptores tirosina-quinasa (RTK)/Ras/PI3K, que incluye alteraciones del receptor del factor de crecimiento epidérmico (del inglés: Epidermal Growth Factor

Receptor, EGFR), mutaciones o deleciones de fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN), un inhibidor de PI3K, y pérdidas de función del gen de la Neurofibromatosis tipo 1 (NF1), un inhibidor de Ras;

- b. la vía de señalización de *p53*
- c. la vía de señalización de Retinoblastoma (RB).
- d. mutaciones en *ATRX* (*Alpha Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-Linked*) y en el promotor de *telomerase reverse transcription* (*TERT*), implicados en la remodelación de la cromatina y regulación de expresión génica (12).

En los gliomas *IDH1* o *IDH2* mutados existe comúnmente asociación con el fenotipo hipermetilado (*CpG island methylator phenotype*, *CIMP*). En los gliomas *IDH* w/t son frecuentes las alteraciones en *EGFR*, *MET*, *NF1* y *PTEN* (12).

Gliomas de bajo grado

En cuanto a los LGG, la clasificación histológica tradicional entre astrocitomas y ODG se complementa con recientes evidencias de dos subtipos molecularmente distintos. Estos subtipos moleculares están caracterizados por la mutación en *IDH1/2*. Las mutaciones somáticas en *IDH1* e *IDH2* son eventos tempranos en el desarrollo tumoral de los gliomas de bajo grado y son de gran significación pronóstica. Están presentes entre el 50- 80% de los gliomas grado II-III. Estas enzimas mutadas generan la conversión de α -cetoglutarato en *D-2-hidroxioglutarato*, un oncometabolito que dirige la actividad oncogénica. Independientemente de los tratamientos los pacientes con estas mutaciones presentan mejor pronóstico que los pacientes no mutados.

Otros biomarcadores se han incorporado para delimitar subgrupos en los gliomas de bajo grado. Ejemplos de ello son las mutaciones de *TERT*, mutaciones y pérdidas de *ATRX*, *BRAF* y *p53* (*TP53*). En los tumores de estirpe oligodendroglial la alteración citogenética más frecuente es la translocación *t1,19(q10;p10)*. La translocación resulta de la fusión de los brazos de *1p* y *19q* acompañado de pérdida de heterocigosidad de *1p* y *19q*. Esta alteración tiene una clara significación pronóstica favorable. En ausencia de la codelección de *1p/19q* estaríamos ante un subtipo astrocítico vs. la presencia de mutación *IDH*, con codelección *1p/19q* y mutación del promotor *TERT* que marcan el subtipo oligodendroglial.

La clasificación histológica para tumores cerebrales primarios de bajo grado comprende:

- El grado I de la OMS incluye lesiones de bajo potencial proliferativo, localizadas y, por tanto, con posibilidad de curación tras resección quirúrgica. El ejemplo más importante es el astrocitoma pilocítico.

Entre los gliomas difusos incluye:

- El grado II de la OMS incluye lesiones infiltrantes con baja actividad mitótica pero que tienden a recurrir y también a progresar hacia grados más avanzados de malignidad.
- El grado III de la OMS oligodendrogliomas y astrocitomas anaplásicos.

La caracterización molecular añade información que ayuda a delimitar subgrupos claros de pacientes:

- Glioma de bajo grado *IDH1* wild-type (w/t): tumores de mal pronóstico, presentan delecciones del cromosoma 10 y ganancias del 7, amplificación de *EGFR*, mutaciones de *PTEN* y del gen de la *NF1*.
- Glioma de bajo grado *IDH1* mutados sin codelección de *1p19q*: tumores de pronóstico intermedio. Presentan *p53* mutado, *ATRX* mutado, *8q24amp*.
- Glioma de bajo grado *IDH1* mutados con codelección de *1p19q*: tumores de buen pronóstico Presentan mutaciones de *CIC*, *FUBP1*, *TERT* y *Notch1*.

Estos subgrupos, basados en el conocimiento de las mutaciones de *IDH1* y la pérdida de heterocigosidad de *1p* y *19q* nos ayudan a predecir el pronóstico junto con las características clínicas del paciente y los factores pronóstico descritos por Pignatti (13):

- edad mayor de 40 años
- histología de astrocitoma
- diámetro ≥ 6 cm
- tumor que cruza la línea media
- presencia de déficit neurológico

Con la nueva clasificación OMS 2016 se organizan categorías que comparten características biológicas comunes, permitiendo así tomar mejores decisiones terapéuticas (12). Sin embargo, la nueva clasificación también crea grupos de tumores que no encajan en estas entidades definidas de forma más restringida: como se ha mencionado anteriormente, la designación NOS se asigna a aquellos tumores que no pueden ser clasificados dentro de los grupos definidos molecularmente.

Gliomas de alto grado

La mayoría de GBM surgen “de novo”, mientras que el GBM secundario se desarrolla a partir de lesiones previas compatibles con gliomas de menor grado. Recientemente se han identificado varios marcadores moleculares clínicamente relevantes que ayudan en el diagnóstico y valoración pronóstica del GBM. El diagnóstico histológico y molecular de GBM se basa en los criterios establecidos en la clasificación de la OMS 2016. Las características histológicas que definen al GBM son tumor infiltrante astrocítico con presencia de necrosis y proliferación microvascular (8). Por definición, el GBM corresponde al grado IV de los astrocitomas en la clasificación de la OMS, y es el tumor primario de SNC con peor pronóstico. Pese a la resección quirúrgica completa su naturaleza infiltrante lleva a tasas de recurrencia local de en torno al 100%.

Los marcadores moleculares son herramientas adicionales para el diagnóstico y evaluación pronóstica del GBM y su determinación ya forma parte de la práctica de rutina. Dependiendo del estado del gen de la isocitrato deshidrogenasa, *IDH* mutado o *wild type* (w/t), los GBM se dividen en dos grupos con diferente pronóstico. Para el análisis del estado de *IDH*, la OMS recomienda la determinación inmunohistoquímica de *IDH1-R132H*, que corresponde a la forma mutada más frecuente. En un estudio por secuenciación de *IDH1* e *IDH2* en 445 muestras de tumores cerebrales primarios se identificaron mutaciones que afectaban al aminoácido *R132H* de *IDH1* en más del 70% de los gliomas grado II y grado III tanto astrocitomas y oligodendrogliomas como glioblastomas secundarios procedentes de lesiones de grado inferior (14). Los tumores que no presentaban la mutación en *IDH1* a menudo presentaban mutación en el aminoácido análogo del gen *IDH2-R172*. Aquellos con mutaciones en *IDH1* e *IDH2* presentaban características genéticas distintas a los no mutados y los pacientes tenían un mejor pronóstico que aquellos con *IDH* w/t (14). En los pacientes < 55 años con *IDH1* w/t si el estudio por inmunohistoquímica fuera negativo se recomienda completar con secuenciación de ambos genes *IDH1* e *IDH2*. En pacientes > 55 años se recomienda la

secuenciación cuando existe historia previa de glioma de grado inferior. En los casos de gliomas difusos la línea media se recomienda el estudio de la mutación de las histonas *H3K27*.

Resulta también relevante determinar el estado de metilación del promotor de *metilguanina-O6-DNA metiltransferasa (MGMT)*, que ha sido ampliamente reconocido como un factor predictivo para la respuesta a agentes quimioterápicos alquilantes como temozolomida (TMZ) en el GBM. El estado de metilación del promotor *MGMT* puede ser evaluado por pirosecuenciación y metilación de PCR específica (del inglés: *polymerase chain reaction*) que son los más utilizados en la práctica clínica.

1.3 Diagnóstico y tratamiento

Diagnóstico

Los tumores cerebrales primarios suponen un importante problema de salud tanto por el deterioro funcional que provocan en el paciente, como por su mal pronóstico vital y la disfunción social que generan tanto en el paciente como en su entorno familiar. Se han consensuado y redactado protocolos que abarcan la mayor parte de la patología tumoral del SNC, aun así, los avances sobre el conocimiento del perfil molecular y epigenético en estos tumores hacen que la actualización para los profesionales sea prácticamente continua. El diagnóstico ante la sospecha de una neoplasia cerebral primaria se realiza mediante los datos obtenidos de una correcta historia clínica (motivo principal de la consulta, antecedentes médicos de interés, antecedentes familiares, situación funcional basal, medicación habitual e historia del proceso actual) y la exploración física (neurológica y general).

Los signos o síntomas que motivan la solicitud de una prueba de neuroimagen (preferente o urgente, según la gravedad del cuadro y velocidad de instauración de los síntomas) con el fin de confirmar o descartar un tumor cerebral, son los siguientes:

- Trastorno focal neurológico que progresa a lo largo de días, semanas o meses.
- Epilepsia focal de nueva aparición en adultos.
- Cefalea inexplicada por otras patologías, especialmente si va acompañada de signos focales neurológicos o datos de hipertensión intracraneal.

Siempre es necesaria una prueba de imagen para iniciar el estudio ante la sospecha de glioma. La elección entre Tomografía Axial Computerizada (TAC) o Resonancia Magnética Nuclear (RMN) va a depender de la situación clínica del paciente. Ambas pruebas tienen indicaciones complementarias:

- la TAC está indicada en enfermos inestables, que a menudo consultan en el Servicio de Urgencias del hospital, con sospecha de hemorragia intracraneal o efecto de masa importante. La TAC también es útil en la detección de lesiones óseas en calota o calcificaciones parenquimatosas.
- la RMN es una técnica con mayor resolución, que caracteriza mejor las lesiones cerebrales por lo que, siempre que no exista una contraindicación absoluta, debe realizarse antes de planificar el tratamiento de los tumores de SNC. La RMN es, por tanto, la prueba de elección en el diagnóstico por imagen de los gliomas.

Tratamiento

El estándar inicial consiste en la resección máxima del tumor. La neurocirugía juega un papel clave en el tratamiento de estos tumores y la mejora en las técnicas quirúrgicas ha supuesto el principal avance en el tratamiento de estos pacientes. Una particularidad de estos tumores es el alto grado de infiltración de sus células, sobre todo en el caso del GBM, que a menudo se presenta multicéntrico haciendo que la cirugía no sea curativa. En este tumor en concreto incluso realizando una resección completa de la lesión, la recidiva es prácticamente segura por lo que es necesario realizar un tratamiento complementario que la disminuya o retrase. Se recomienda una resección quirúrgica amplia que por otro lado preserve la función neurológica del paciente (15). Con esto se consigue:

- Un diagnóstico histológico preciso al disponer de mayor cantidad de muestra que con la biopsia estereotáxica.
- Una reducción de la masa tumoral con mejoría de los síntomas provocados por ésta (edema, hidrocefalia...).

Es importante recordar, como se ha mencionado anteriormente, que la cirugía nunca es curativa en los gliomas de alto grado por el alto potencial de infiltración de sus células. Por ello se administra radioterapia (RT) sobre el lecho quirúrgico con quimioterapia alquilante

concurrente y/o secuencial como tratamiento postquirúrgico de rutina (10). El estándar actual en el tratamiento de GBM es la resección quirúrgica seguida de RT adyuvante con TMZ (16,17). Pese a estos tratamientos, muchos pacientes no se beneficiarán y presentarán síntomas neurológicos que deteriorarán su calidad de vida además de una supervivencia muy corta. La mediana de supervivencia en pacientes recién diagnosticados de GBM que reciben el estándar terapéutico actual es de 14,6 meses. El pronóstico de este tipo de tumores sigue siendo infausto (16).

En estos pacientes el estándar terapéutico no presenta avances desde el año 2005 cuando se demostró que la adición de TMZ concurrente con RT sobre el lecho quirúrgico y posterior TMZ secuencial en el GBM recién diagnosticado tenía como resultado un beneficio clínico y estadísticamente significativo en la supervivencia global con toxicidad adicional mínima. Por ello los gliomas de alto grado deben ser objeto de futuras investigaciones tanto moleculares como terapéuticas para intentar aportar mejoras a estos pacientes.

En otros tumores como el cáncer de mama o pulmón la determinación del estatus de oncogenes como *EGFR*, *human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)* y *anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase (ALK)*, cuya expresión puede ser bloqueada, ha supuesto un avance. Actualmente sabemos que la señalización de *EGFR* es extremadamente influyente en el desarrollo del GBM. Se ha demostrado que la expresión aberrante de *EGFR* juega un papel importante en la invasión y angiogénesis de este tumor (18). Sin embargo y a pesar de estar alterado en más de la mitad de los casos, los intentos de bloqueo del *EGFR* en GBM han fracasado hasta la fecha (18). Tampoco están teniendo éxito los tratamientos dirigidos contra la angiogénesis a pesar de que la histología del GBM se caracteriza por una marcada proliferación vascular con interrupción de la barrera hematoencefálica (BHE), lo cual resulta en un aumento de la captación de contraste en la RMN (19,20) .

La proliferación vascular que lleva al desarrollo inadecuado y aberrante de la vasculatura tumoral es causado en parte por niveles anormales de factores de crecimiento, secretados tanto por células tumorales como estromales, entre los cuales el factor de crecimiento endotelial vascular (*VEGF*, del inglés: *Vascular Endothelial Growth Factor*) juega un papel importante (21). Las células tumorales secretan niveles altos de factores pro-angiogénicos que contribuyen a la construcción de una vasculatura desorganizada e inmadura. Este proceso conocido como angiogénesis tumoral es necesario para el desarrollo del tumor. Los tumores no

pueden crecer más de 1-2 milímetros sin un suministro de nutrientes y oxígeno por parte de la vasculatura (21). En otros tumores como el cáncer renal, el cáncer de pulmón, algunos tumores digestivos o el cáncer de ovario, la inhibición de *VEGF* con fármacos como bevacizumab han demostrado beneficios en términos de supervivencia. Bevacizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado contra el factor de crecimiento endotelial vascular.

En GMB la falta de opciones terapéuticas tras la progresión al tratamiento de primera línea con RT y TMZ ha llevado a explorar los tratamientos anti-angiogénicos. Bevacizumab se utiliza en pacientes con GBM recurrente desde su aprobación en Estados Unidos por la FDA (*Food and Drug Administration*) en 2009 (20). En Europa esta indicación del fármaco sigue pendiente de autorización por la EMA (*European Medicament Agency*) y por ello su uso se realiza fuera de ficha técnica. No obstante, el beneficio del bevacizumab en el GBM es transitorio con una progresión tumoral tras una mediana de 4 meses. Algunos pacientes con GBM se benefician del efecto anti edema que produce permitiendo la reducción del uso de corticoides, así como los efectos secundarios asociados a los mismos. Además es importante destacar que el uso de bevacizumab no ha demostrado tener un efecto negativo en la calidad de vida en los distintos estudios aleatorizados (20).

Ante el fracaso del tratamiento anti-angiogénico, existe actualmente una necesidad de nuevas terapias para los pacientes con glioma. Recientemente la inmunoterapia se ha convertido en una estrategia ampliamente exitosa para una gran variedad de tumores (22). El tratamiento con inmunoterapia en cáncer pretende restablecer la respuesta inmune del organismo contra el tumor. Esto ha conseguido mejoras destacables en pacientes con melanoma, cáncer de pulmón y cáncer renal entre otros. A continuación, profundizaremos más acerca del mecanismo de estos fármacos y su papel en el tratamiento de los gliomas y otros tumores.

1.4 Inmunoterapia en el tratamiento del cáncer

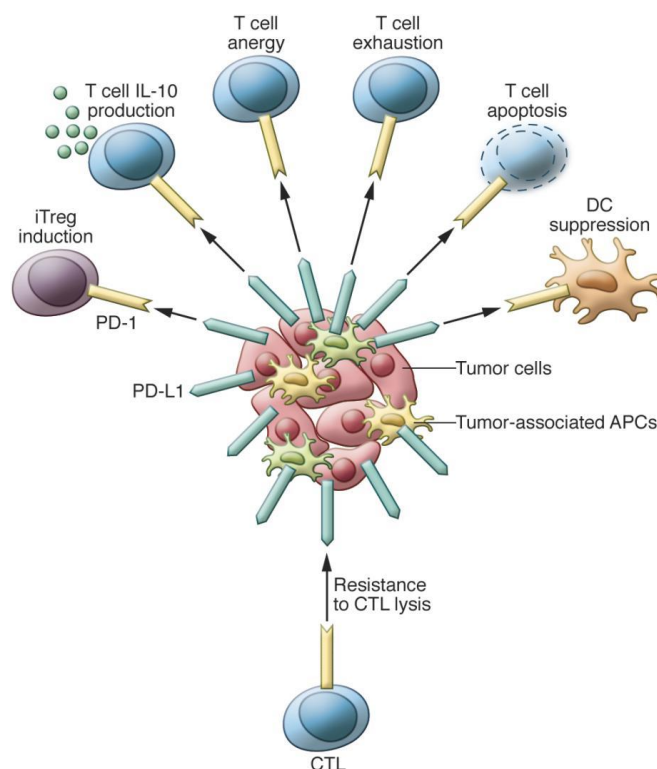
El concepto de que el sistema inmune puede reconocer y controlar el crecimiento tumoral se remonta a 1893 cuando William Coley usó bacterias vivas como un estimulante del sistema inmune para tratar el cáncer (22). Lo hizo tras observar que uno de sus pacientes afectos de sarcoma había mejorado considerablemente de su enfermedad neoplásica tras superar una infección por *Streptococcus*. Fue entonces cuando comenzó a desarrollar la hipótesis de que quizá la mejora del paciente estaba relacionada con el incremento de la respuesta inmunitaria provocado por la infección bacteriana. Sin embargo, hasta las dos últimas décadas el entusiasmo

por la inmunoterapia contra el cáncer ha sido moderado debido a la limitada eficacia clínica. Esta limitación se debe a la capacidad que tienen las células tumorales para evitar el reconocimiento y la eliminación por parte del sistema inmune, esto les permite establecerse y proliferar en el huésped (23).

La inmunoterapia se basa en el reconocimiento de la célula tumoral como algo extraño y el establecimiento de la respuesta inmune del organismo frente al tumor. La interacción entre célula tumoral y linfocito ha sido objeto de exhaustivos estudios en los últimos tiempos. Los linfocitos T se encargan de eliminar las células tumorales mediante el reconocimiento de antígenos proteicos a través del receptor de las células T (TCR, del inglés *T-Cell Receptor*). Los antígenos tumorales son reconocidos y procesados para posteriormente asociarse a moléculas de compatibilidad conocidas como complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés *Major Histocompatibility Complex*). Dentro de la población celular T encontramos dos subpoblaciones, los linfocitos cooperadores o T CD4+, y los linfocitos citotóxicos o T CD8+.

La vía de muerte celular programada (PD-1, del inglés, *Programmed Cell Death Protein 1*) es un mecanismo de regulación negativa de la actividad de las células T utilizado por las células tumorales para suprimir la eficacia antitumoral de los linfocitos. Las células tumorales pueden expresar altos niveles de ligando de muerte programada (PD-L1, *Programmed Death Ligand-1*) (24). La interacción de PD-1/PD-L1 induce por tanto inmunosupresión en el microambiente tumoral (Figura 1).

Figura 1. Mecanismos de inmunosupresión en el ambiente tumoral inducidos por la vía PD-1/PD-L1.



Fuente: Chen L. y Han X. *Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present, and future* (24).

El bloqueo de esta vía ha supuesto un avance en el tratamiento de diferentes tumores sólidos. La inhibición del punto de control inmunitario a partir de anticuerpos monoclonales dirigidos a PD-1 o PD-L1 ha demostrado resultados significativos en el tratamiento de melanoma (25,26) y cáncer de pulmón no microcítico (27,28), entre otros. El mecanismo consiste en evitar el bloqueo que sufren los linfocitos CD4 generados frente a neoantígenos tumorales en el ganglio linfático y en el propio tumor. Otra vía de especial importancia es la de CTLA-4 (*Cytotoxic T Lymphocyte antigen-4*), receptor proteico situado en la membrana del linfocito T. La estimulación de CTLA-4 produce inhibición en la función del linfocito T. El desarrollo de fármacos bloqueadores de este receptor y por tanto estimuladores de la respuesta inmune frente al tumor ha supuesto un gran interés. El anticuerpo anti-CTLA-4: ipilimumab ha mejorado la supervivencia en pacientes con melanoma metastásico (29). Estos fármacos también han sido probados en gliomas donde existe una necesidad de nuevas líneas terapéuticas tanto en primera línea como en el tratamiento a la recurrencia. El ensayo clínico fase 3 CheckMate548 (NCT02667587) evaluaba la adición de nivolumab (anti- PD-1) al tratamiento con RT-TMZ de primera línea en pacientes con GBM y metilación de *MGMT*. Los resultados

de supervivencia libre de progresión (SLP) disponibles hasta la fecha no demuestran beneficio a favor de la combinación de RT-TMZ-nivolumab. El CheckMate143 (NCT02017717) fue el primer ensayo randomizado fase 3 que evaluó la inhibición de la vía PD-1 en pacientes con GBM recurrente. Comparaba el tratamiento con nivolumab (anti-PD-1) con el inhibidor del factor de crecimiento del endotelio vascular (anti-VEGF) bevacizumab. Los resultados presentados revelan que nivolumab no mejoró la supervivencia global (SG) de estos pacientes (30). Hasta la fecha, por tanto, no se ha demostrado beneficio con inmunoterapia en términos de SLP y SG en pacientes con gliomas. El ambiente inmunosupresor de estos tumores es objeto de estudio en la actualidad. Estudios recientes destacan la importancia de la comunicación neuro-inmune en el mantenimiento de la homeostasis, los trastornos del SNC, la defensa del huésped y las lesiones (31).

1.5 La respuesta inmune: generalidades

Nos referimos a la respuesta inmune como el conjunto de procesos llevados a cabo por el sistema inmunitario que se encargan de la defensa natural de nuestro organismo. Es importante señalar que existen dos tipos de respuestas:

- Inmunidad innata: representa la primera respuesta del organismo frente a agentes extraños, también frente al cáncer. Para llevar a cabo su labor cuenta con elementos mecánicos, químicos y celulares:
 - Mecánicos: piel y mucosas
 - Químicos: secreciones y mucosas
 - Celulares: macrófagos, granulocitos, células dendríticas
- Inmunidad adaptativa (adquirida o específica): es la respuesta que se activa y desarrolla en función del patógeno desencadenante. Es decir, se activa específicamente y su intensidad de respuesta al antígeno aumenta en la segunda exposición al mismo. Es lo que conocemos como respuesta de memoria.

Es importante destacar que la división del sistema inmunitario en innato y adaptativo facilita su estudio, pero ambas respuestas trabajan de manera conjunta y se potencian mutuamente para generar respuestas. Las células dendríticas son células hematopoyéticas que establecen comunicación entre la respuesta innata y la adaptativa (32).

Actualmente sabemos que mutaciones y alteraciones genómicas son causa fundamental de la carcinogénesis y pueden generar péptidos "de novo" que resultan extraños para el organismo. Adecuadamente captados por una célula presentadora de antígenos estos péptidos pueden generar activación de linfocitos T. Pero el proceso de activación frente a la célula tumoral es complejo. Si en la sinapsis entre linfocito T y célula presentadora de antígeno existe interacción con la proteína CTL4, el linfocito T no se activa y entra en anergia (inactivo). Como hemos comentado previamente esta es la diana de fármacos como ipilimumab o tremelimumab. Otro punto de bloqueo ocurre en el tumor, las células neoplásicas expresan PD-L1 (ligando de PD1), que al unirse al receptor PD1 del linfocito T evita la acción lítica de este. La relación linfocito T-célula tumoral es de gran interés en el estudio y tratamiento de múltiples tumores.

1.6 El ambiente inmunosupresor en gliomas

El GBM es inmunogénico, pero está asociado con una marcada inmunosupresión local y sistémica. De hecho una característica distintiva del GBM es el desarrollo de un MT profundamente inmunosupresor capaz de detener las respuestas inmunitarias antitumorales endógenas y capaz de limitar la efectividad de la inmunoterapia (33). El MT del GBM comparte características con tumores que si han respondido a la inmunoterapia pero es único por las células residentes del SNC. Además, la BHE, estructura que lo aísla, contribuye a que el cerebro sea considerado un órgano inmunológicamente privilegiado con regulación muy precisa de las respuestas inmunes, lo que conduce a un entorno más inmunosupresor (34). A continuación, intentaremos detallar las características del MT en el GBM.

Componentes celulares del MT cerebral

El MT en el GBM es único en su composición. Tanto las células inmunes como no inmunes que lo componen lo hacen único y contribuyen a su alta inmunosupresión y fenotipo "frio" (34). En los gliomas el MT está compuesto por una proporción importante de células no neoplásicas, entre las cuales se incluyen células inflamatorias infiltrantes así como células residentes del SNC: astrocitos, microglía, neuronas y vasos (35).

Células inmunes

En este MT los linfocitos infiltrantes tumorales (TILs, del inglés *Tumor-infiltrating lymphocytes*) tienen el potencial de ejercer ambas funciones: pro- y antitumoral (34). La

caracterización funcional de los TILs en el MT de estos tumores ha demostrado el deterioro de las funciones efectoras de estas células con un fenotipo exhausto que las convierte en ineficaces en sus funciones de defensa (36). Aunque los gliomas se desarrollan dentro del cráneo y rara vez hacen metástasis, estos pacientes presentan una inmunosupresión sistémica profunda y exhiben una disminución de la función celular inmune (37). Frecuentemente tienen linfopenia marcada en sangre periférica y existe una disfunción de la población de células T, que se manifiesta sobre todo en el subconjunto de células T CD4⁺ (38) con respuestas proliferativas debilitadas y síntesis insuficiente de linfocitos T *helper* 1 (Th1) e IL2 (39).

En el MT cerebral los linfocitos T CD4⁺, o no reconocen los antígenos generados por las células tumorales o entran en anergia y pasan a ser T reguladores (Tregs, CD4-Fosp3⁺), que son células inmunosupresoras. Estas células inmunosupresoras son un subconjunto de linfocitos T que desempeñan una función importante en el mantenimiento de la homeostasis inmune y la protección del organismo frente a enfermedades autoinmunes. Las propias células tumorales liberan importantes cantidades de factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta) (40), IL-10 (41) y CCL2 (MCP-1) (42) y consiguen reclutar o transformar células inmunosupresoras como las anteriormente mencionadas Tregs, las células supresoras derivadas de la médula ósea *Myeloid Derived Suppressor Cells* (MDSC), y los macrófagos y microglía (también denominados, *Tumor Associated Macrophages* (TAM)), que infiltran el propio tumor entorpeciendo la función de los linfocitos. Hasta la fecha los esfuerzos dirigidos a la depleción de estas células inmunes pro-tumorales han mostrado resultados muy modestos en el incremento de la actividad de los TILs (34).

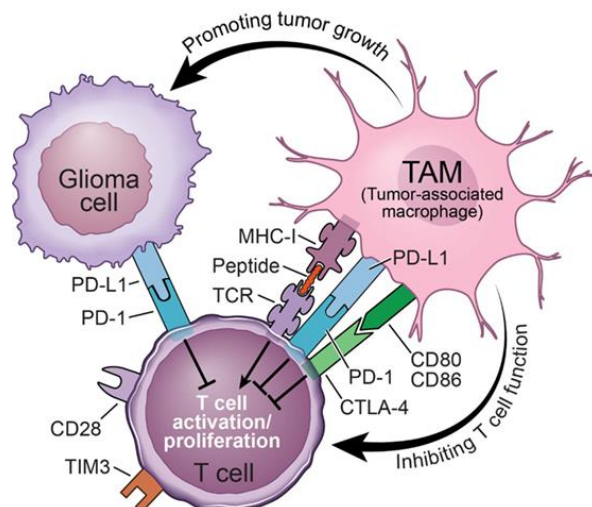
La alta proporción de Tregs se asocia a la falta de actividad de los linfocitos T CD4⁺ y, al contrario, la depleción de Tregs consigue que vuelvan a proliferar las células T CD4⁺ junto con un descenso de citoquinas tipo Th-2 e interleuquinas 4 y 10 (IL4 e IL10) y un aumento de citoquinas tipo Th-1 (IL6, IL2, TNFalfa e INFgamma) (37). La cantidad de TILs CD8⁺ está generalmente reducida en los gliomas de alto grado mientras que el número de Tregs esta aumentado. Los Tregs provocan tolerancia a los antígenos tumorales y se han observado, en sangre periférica y en el MT, fracciones superiores a las fisiológicas en pacientes con distintos tipos de neoplasias (43). Los linfocitos T CD8, citotóxicos, también están bloqueados por las IL inmunosupresoras, y por efecto de las Tregs o las MDSC. Los T CD8 no actúan contra las células tumorales porque estas reducen la expresión de moléculas HLA de clase 1. Las propias células gliales expresan moléculas que impiden la acción lítica de los linfocitos. De especial

interés es la expresión de FAS ligando (FasL) (44) PD-L1 y PD-L2 (45) en GBM, así como la unión a sus ligandos, expresados en el linfocito T, que pueden producir bloqueo de la respuesta inmune contra tumor.

Distintos trabajos se han llevado a cabo con el fin de analizar la expresión de PD-L1 en las células de GBM. La tasa de pacientes con cualquier nivel de expresión de PD-L1 en células tumorales gliales ha resultado heterogénea a lo largo de los diferentes estudios (46). En el trabajo de Nduom E.K, et al. se demostraba expresión de PD-L1 en el 61% de pacientes con GBM (47) mientras que los resultados de la investigación de Berghoff A.S, et al. arrojan expresiones de PD-L1 en el 88 % de pacientes con GBM de reciente diagnóstico y en el 72% de pacientes con GBM recurrente (48). Estas variaciones en los resultados pueden estar relacionadas con diferencias en la metodología y en el análisis así como con el uso de distintos anticuerpos y tinciones inmunológicas (46). La sinapsis inmunológica generada por la interacción PD1/ PDL1 es un punto clave y objeto de estudio en la actualidad.

Las MDSC y los TAM son una población heterogénea de células mieloides inmaduras que se acumulan en el tejido tumoral y aumentan en sangre periférica de los pacientes con glioma. Son difíciles de distinguir entre ellas, ya que expresan los mismos marcadores (CD68+/CD11b+/HLA-DR-) y tienen una función similar. En el MT del GBM nos referimos a TAM como conjunto de dos poblaciones de macrófagos: los macrófagos/monocitos derivados de la médula ósea (BMDM, del inglés: *Bone marrow-derived macrophages/monocytes*) y la microglía (49). Ambos subtipos son células mononucleares que, paradójicamente, pueden inhibir los linfocitos CD4 y CD8. De hecho se sabe que, en el MT del GBM, los TAM tienen distintos roles pro-tumorales y su acumulación se relaciona con el grado tumoral (50) (Figura 2). Existen evidencias actuales que indican que TAM apoya el crecimiento y la invasión de las células de glioma a partir de distintos mecanismos. Uno de los principales efectos es que los TAM generan señales de supervivencia y de proliferación para las células tumorales. La producción de citoquinas que reducen la migración e infiltración de células inmunes (51) es también un mecanismo de inmunosupresión en el MT de gliomas bien descrito en la actualidad. En definitiva, se ha encontrado que TAM es un importante contribuyente del MT inmunosupresor en gliomas (Figura 3).

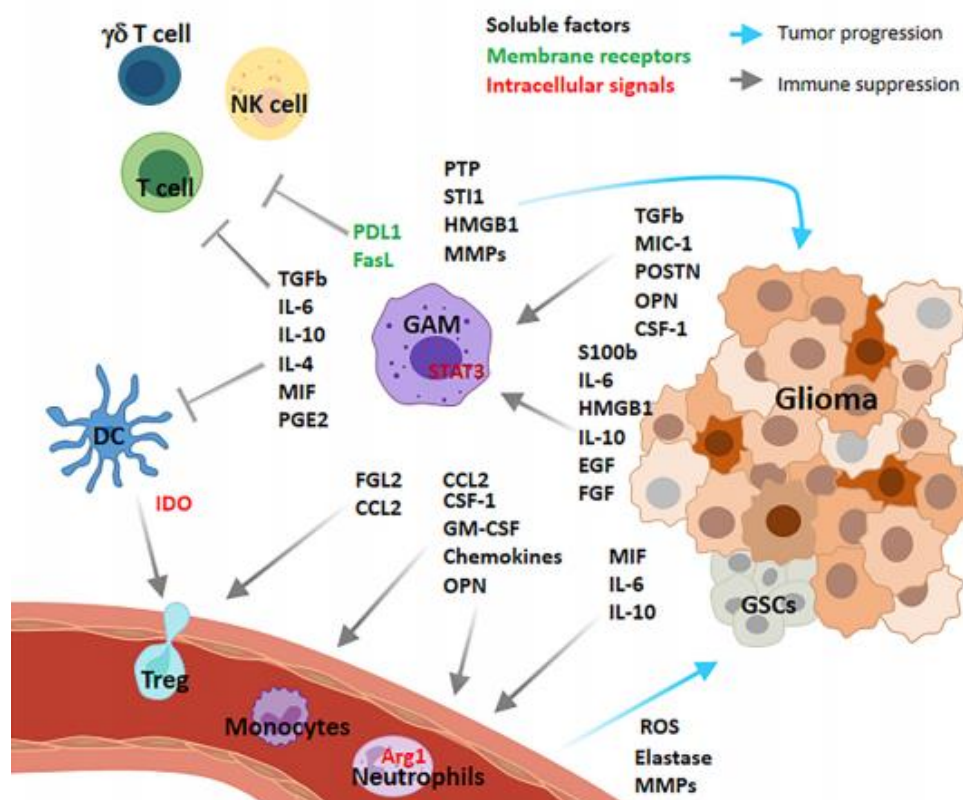
Figura 2. Mecanismos de TAM para inhibir las funciones de las células T y promover el crecimiento tumoral en GBM.



Fuente: Chen Z y Hambarzumyan D. *Immune microenvironment in glioblastoma subtypes* (52).

Otras células a tener en cuenta dentro del infiltrado inmune tumoral son las *Natural Killer* (NK). Las NK son células linfoides innatas que representan en torno al 10% de todos los linfocitos circulantes (53) y se activan contra las células tumorales en distintas neoplasias. En GBM las NK representan un componente menor del MT, en torno al 2% de las células del infiltrado inmune.

Las células tumorales de GBM expresan HLA-G, antígeno HLA de clase 1 del sistema de histocompatibilidad. Las moléculas HLA-G inducen inmunotolerancia y suprimen la actividad lítica de las células NK y los linfocitos T. Por tanto, la expresión de HLA-G en las células de GBM actúa como un ligando inhibitorio para las células NK activadas (54). Además, en los pacientes con glioma los NK circulantes están disminuidos en comparación con controles sanos (55).

Figura 3. Células mieloides en el MT de los gliomas.

Fuente: Locarno C.V, et al. Role of myeloid cells in the immunosuppressive microenvironment (56).

Células no inmunes

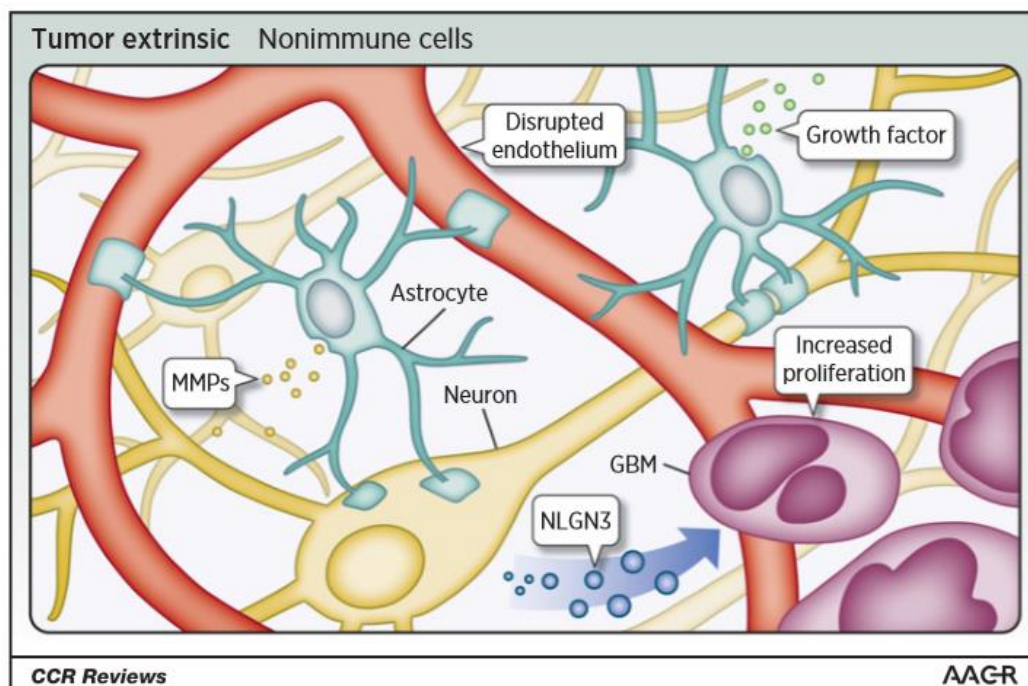
En el MT de los gliomas existen componentes estromales, no inmunes, que también favorecen a la inmunosupresión generada alrededor de las células tumorales (Figura 4). La BHE fue descrita por primera vez en 1885 por el investigador Paul Ehrlich quien observó que al introducir un tinte en el riego sanguíneo de un animal el encéfalo quedaba exento de teñirse de color. Las hipótesis iban a favor de un sistema de protección alrededor del órgano. Años más tarde este sistema de protección membranoso sería descrito por Lewandowski y bautizado como la actualmente conocida BHE. Desde entonces, esta estructura ha sido objeto de múltiples estudios de interés médico global.

En su estado normal, la BHE genera una restricción a la permeabilidad de múltiples agentes terapéuticos, especialmente moléculas hidrofílicas y de gran tamaño (34). En los gliomas la BHE pierde su integridad estructural. En esta situación patológica existe una diferencia de permeabilidad a través de la BHE entre el tumor macroscópico y el cerebro infiltrado (57,58). Una vasculatura aberrante y de organización atípica es característica de los

gliomas de alto grado donde con frecuencia se genera: edema, hipoxia y necrosis. Además la similitud biológica entre la red vascular y la red neuronal en los gliomas lleva a pensar que quizá la célula precursora del glioma: *glioma stem cell* (GSC), sea capaz de diferenciarse hacia células endoteliales (59) generando la vasculatura del glioma y dando lugar a depósitos de GSC en el nicho perivascular donde están aisladas y pueden proliferar de forma segura (60,61). Por tanto, las GSC llevan a las células de GBM a crecer y desarrollar resistencias a tratamientos a partir de la inducción de un MT inmunosupresor y son otro elemento a tener en cuenta.

Los astrocitos conforman una red de sostén para las neuronas y, como ya hemos mencionado, representan en torno al 30% de las células gliales. Mantienen la homeostasis del medio y se localizan principalmente en el nicho perivascular. Una de sus funciones principales es mantener la BHE (62). De ellos derivan la mayor parte de tumores agresivos primarios de SNC (astrocitomas). En el tejido sano los astrocitos secretan factores de crecimiento y citoquinas capaces de reparar el daño tisular producido por distintos tipos de lesiones. Este proceso de “curación de heridas” a nivel tisular es conocido como gliosis reactiva (63). En el MT se ha demostrado que estos factores de crecimiento secretados por los astrocitos apoyan el crecimiento tumoral y median resistencias a tratamientos (64). Los astrocitos también secretan metaloproteinasas: enzimas proteolíticas implicadas en la creación de un ambiente favorable para la invasión tumoral (65).

Por otro lado las neuronas, células excitables y específicas del tejido nervioso apoyan también la progresión de los gliomas a partir de señales mitogénicas que impulsan el crecimiento de las células madre: *neural stem cell* (NSC) (66). La neuroligina-3 (NLGN3) es una proteína codificada por el gen *NLGN3* y está envuelta en la formación y remodelado de las sinapsis neuronales. Mutaciones en este gen pueden estar asociadas con el espectro autista. Actualmente existen datos que indican que NLGN3 apoya la proliferación de las células de glioma a partir de la vía de señalización PI3K. Se ha demostrado además que en humanos la expresión de NLGN3 en GBM se correlaciona inversamente con la supervivencia del paciente (67).

Figura 4. Células no inmunes del MT en gliomas.

Fuente: Tomaszewski W, et al. Brain tumor microenvironment and host state: implications for immunotherapy (34).

Con todo lo anterior sabemos que son múltiples los elementos celulares y estructurales que generan el MT inmunosupresor tan característico de los gliomas. No solo las células inmunes si no también: BHE, astrocitos, neuronas y microglía son claves en la formación del MT (Figura 4). El resultado de esto es que la inmunoterapia, eficaz en tumores más inmunogénicos (melanoma o pulmón), no ha demostrado beneficio hasta la fecha en los tumores cerebrales. Debido a la gran heterogeneidad y la importante capacidad adaptativa de las células de glioma existe la necesidad de investigar acerca de la combinación de terapias antigénicas específicas con terapias que reduzcan de forma dirigida la inmunosupresión del estroma tumoral (34). Existe un interés creciente en dirigir las terapias no solo a las células tumorales sino también al MT, incluyendo vasos sanguíneos, monocitos/macrófagos/microglía y células T (68).

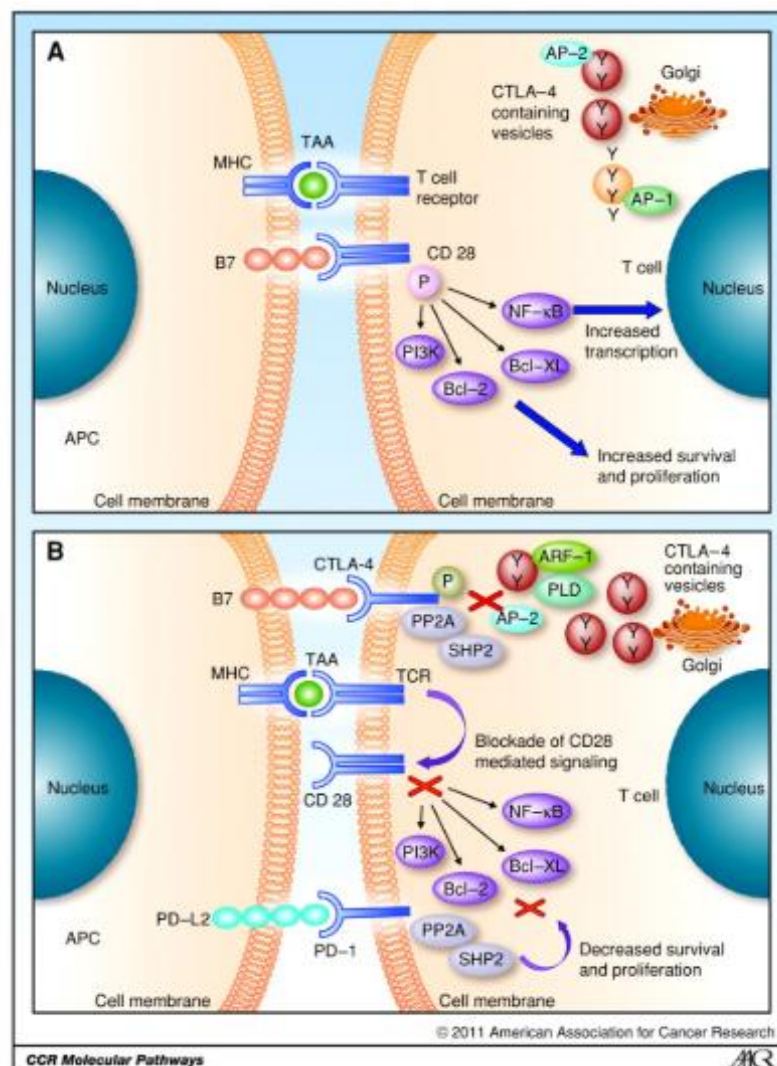
1.7 Carga Mutacional Tumoral: concepto e implicación en gliomas

La inmunoterapia contra el cáncer se basa en la capacidad del sistema inmunitario para dirigirse contra antígenos específicos de tumor y generar una respuesta (69). La activación de las células T contra antígenos específicos del tumor requiere múltiples señales y es un proceso complejo. El cebado de las células T se inicia con el procesamiento de los antígenos tumorales

por la célula presentadora de antígenos (APC). Los fragmentos resultantes, antígenos asociados a tumor, se unen al MHC presente en la superficie de la APC. Esto permite la detección y unión del antígeno tumoral al TCR. Para completar la activación de la célula T, se necesita una segunda señal co-estimuladora creada por la unión de CD28 en la célula T, con B7 ubicado en la célula presentadora de antígeno (Figura 5).

Existen puntos de control como CTLA-4 asociado a los linfocitos citotóxicos. Estos puntos de control sirven para atenuar esta señal y su papel es clave en la regulación del sistema inmune. De esta forma CTLA-4 se ha convertido en objetivo terapéutico en tumores como el melanoma a partir del desarrollo de anticuerpos monoclonales dirigidos contra él.

Figura 5. Cebado y activación de las células T en respuesta a un epítipo antigénico específico.

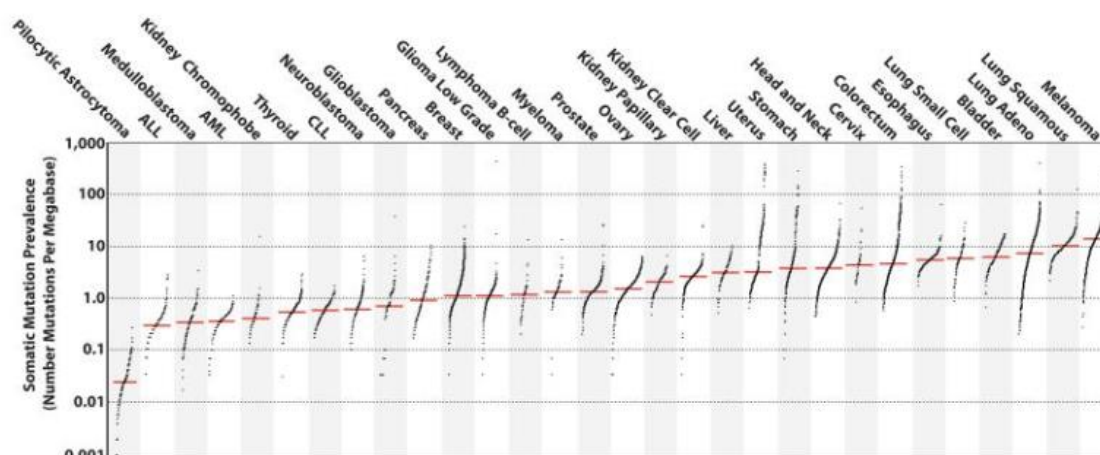


Fuente: Salama A.K.S, et al. Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 (69).

La activación de las células T, debe ir precedida del cebado de las mismas en respuesta a un antígeno tumoral específico. Los antígenos tumorales o neoantígenos son aquellos que se encuentran en la superficie de las células del tumor y son presentados por moléculas MHC I o MHC II. Son clave para que se desarrolle la respuesta inmune contra tumor. Actualmente sabemos que existe una correlación entre la carga mutacional del tumor (TMB, del inglés: *Tumor Mutational Burden*), la carga neoantigénica, el infiltrado inmune intratumoral y la respuesta inmune asociada.

Ya existen trabajos donde se relaciona el TMB con la respuesta a inmunoterapia. En concreto en un trabajo de Jonhson D.B, et al. relacionaban el número y tipo de mutaciones estudiadas por secuenciación en pacientes diagnosticados de melanoma con la respuesta a inmunoterapia. Para ello secuenciaban en torno a 300 genes en muestras de pacientes que habían recibido terapias anti-PD-1/PD-L1. La secuenciación era validada en dos centros independientes. Los resultados mostraron que los pacientes que habían presentado mejores respuestas a inmunoterapia tenían un TMB mayor en comparación con los no respondedores. La tasa de respuesta, SLP y SG fueron superiores en los pacientes con TMB alto en comparación con los pacientes con TMB intermedio o bajo. Esto en un futuro podría proporcionarnos predictores clínicos de respuesta a anti-PD-1/PD-L1 en distintos tumores (70).

Es importante destacar que en gliomas el TMB es generalmente bajo en comparación con otros tumores. En el trabajo de Alexandrov L.B, et al. estudiaron la prevalencia de mutaciones somáticas en distintos tipos de cáncer. En la Figura 6 cada punto negro representa una muestra tumoral analizada. Las líneas horizontales en rojo son la cantidad media de mutaciones en los distintos tipos de tumor representados en el eje horizontal. El eje vertical muestra el número de mutaciones por Megabase (71). Entre los tumores con menor TMB están el GBM, el astrocitoma pilocítico y también el meduloblastoma, que es el tumor primario de SNC más frecuente en niños cuyo origen se encuentra en las células embrionarias. Estos tumores con bajo TMB podrían presentar escasa respuesta a inhibidores del punto de control inmune.

Figura 6. Prevalencia de mutaciones somáticas en distintos tumores.

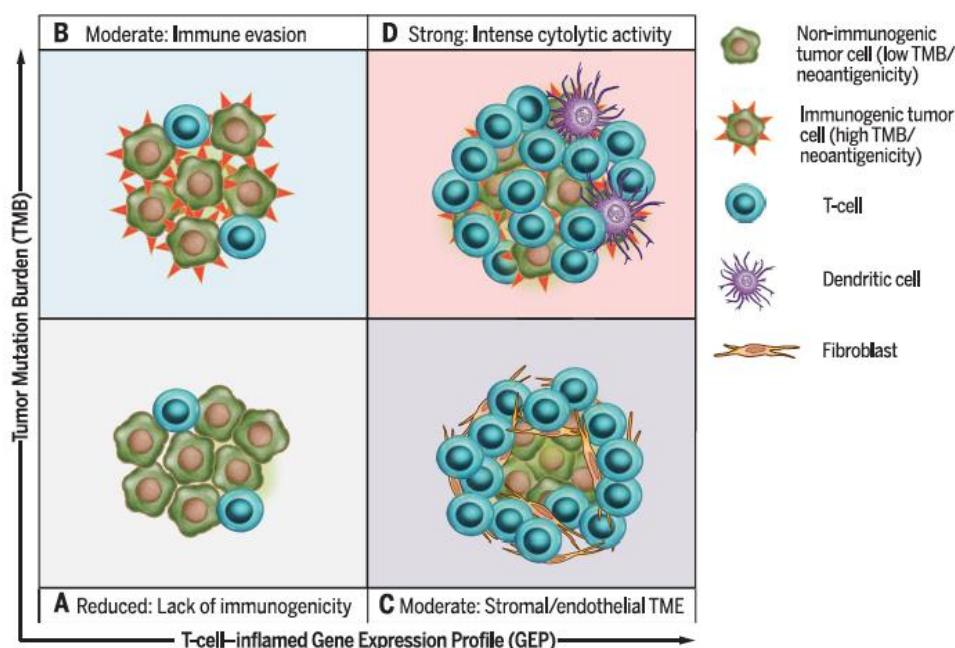
Fuente: Alexandrov LB, et al. *Signatures of mutational processes in human cancer* (71).

En base a todo esto, en el estudio publicado por Cristescu R, et al. se evaluaba la combinación de diferentes biomarcadores en más de 300 pacientes con 22 tipos de tumores tratados con pembrolizumab dentro de ensayo clínico (72). Concluían que el TMB y los marcadores inflamatorios identificados podían estratificar los tumores según las diferentes respuestas a pembrolizumab (72). Es a día de hoy uno de los trabajos más importantes para comprender las respuestas tumorales a inmunoterapia. Un estudio traslacional que se ha convertido en un verdadero hito en nuestra comprensión del efecto de los inhibidores del punto de control inmune. Varios estudios han demostrado antes que el TMB y los elementos citolíticos del MT están asociados con la respuesta clínica a la inmunoterapia. Sin embargo, la relación entre estos dos aspectos centrales de la inmunobiología tumoral y su asociación combinada con la respuesta clínica en distintos tipos de cáncer continúan siendo objeto de estudio.

Sabiendo que la inmunoterapia provoca respuestas duraderas en múltiples tumores interesa desarrollar biomarcadores predictores de respuesta que identifiquen a aquellos pacientes que obtendrán mayor beneficio terapéutico. Hasta la fecha se han validado como biomarcadores predictivos de respuesta al anticuerpo monoclonal anti-PD-1 pembrolizumab la expresión del ligando de PD-1 (PD-L1) y la inestabilidad de microsatélites (MSI del inglés: *Microsatellite Instability*), con independencia del tipo de tumor (72). Asimismo, el TMB y el perfil de expresión génica de células T inflamadas (GEP) que representa una firma de genes proinflamatorios son potenciales biomarcadores predictivos aún por estudiar en profundidad. En este trabajo tenían como objetivo evaluar la utilidad clínica individual y conjunta de TMB y GEP en la predicción de respuesta a pembrolizumab. Para evaluar la utilidad clínica individual

y conjunta los pacientes se estratificaron en 4 grupos establecidos por biomarcadores (GEP low-TMB low (GEP_{lo} TMB_{lo}), GEP low-TMB high (GEP_{lo} TMB_{hi}), GEP_{hi}-TMB_{lo} y GEP_{hi}-TMB_{hi}) a partir de cortes predefinidos en los valores de TMB y GEP (72) (Figura 7). Intentaban demostrar si estos 4 fenotipos teóricos definidos a partir de TMB y GEP presentaban respuestas diferentes a pembrolizumab. Para ello radiólogos centrales evaluaron las respuestas en 3 cohortes predefinidas: pan-tumor (distintos primarios), tumores de cabeza y cuello y melanoma. Se definía al paciente respondedor como aquel que presentaba respuesta parcial (*Partial Response*: PR) o repuesta completa (*Complete Response*: CR). El no respondedor era aquel que no presentaba ni PR ni CR. Se objetivó que las tasas de respuesta fueron significativamente mayores en aquellos pacientes con TMB_{hi} y GEP_{hi} en comparación con aquellos con TMB_{lo} y GEP_{lo} en las 3 cohortes del estudio. Destaca el hecho de que no se observaron respuestas en el grupo TMB_{lo} y GEP_{lo} en la cohorte pan-tumor y cabeza y cuello. La SLP también fue superior en los pacientes TMB_{hi} y GEP_{hi}. Estos resultados muestran como de forma conjunta el TMB y GEP pueden estratificar pacientes con distintos tumores según la predicción de respuesta clínica a pembrolizumab.

Figura 7. Cuatro grupos definidos por biomarcadores (TMB y GEP).

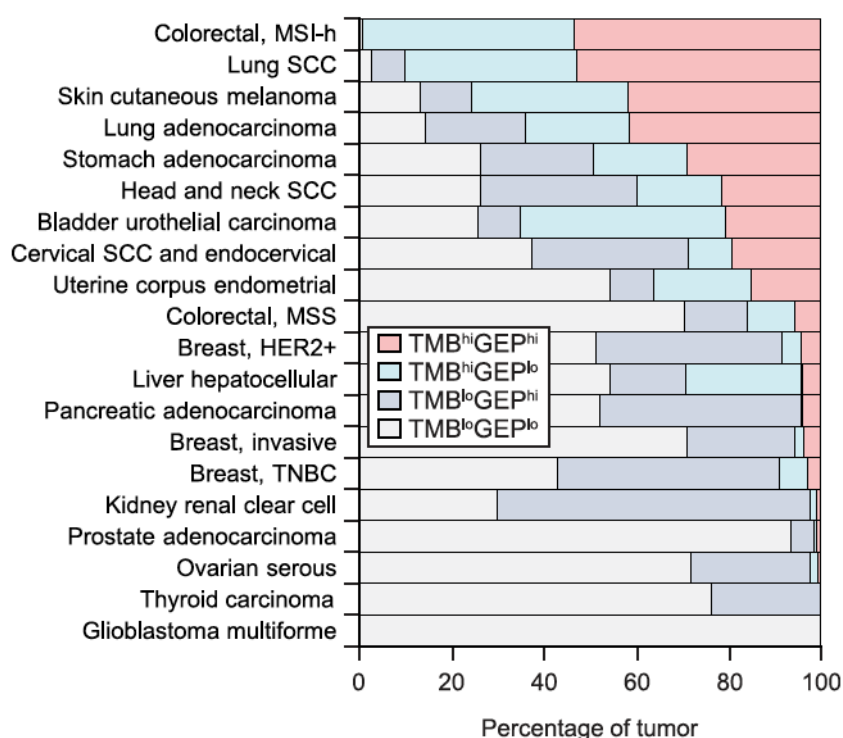


Fuente: Cristescu R, et al. Pan-tumor genomic biomarkers for PD-1 checkpoint blockade– based immunotherapy (72)

Para explorar si esta estratificación podía extrapolarse a más tumores, se evaluó adicionalmente en *The Cancer Genome Atlas Program* (TCGA) un conjunto de más de 6000

pacientes. Encontraron el porcentaje de tumores dentro de cada uno de los 4 subgrupos. Como se puede ver en la Figura 8, el GBM presenta TMB^{lo} y GEP^{lo} lo que nos lleva a pensar una vez más en la escasa respuesta a inmunoterapia que ha mostrado hasta la fecha y en la necesidad de desarrollar terapias a partir de otros mecanismos de acción.

Figura 8. Relación entre TMB y GEP en distintos tumores incluidos en TCGA.



Fuente: Cristescu R, et al. Pan-tumor genomic biomarkers for PD-1 checkpoint blockade– based immunotherapy (72).

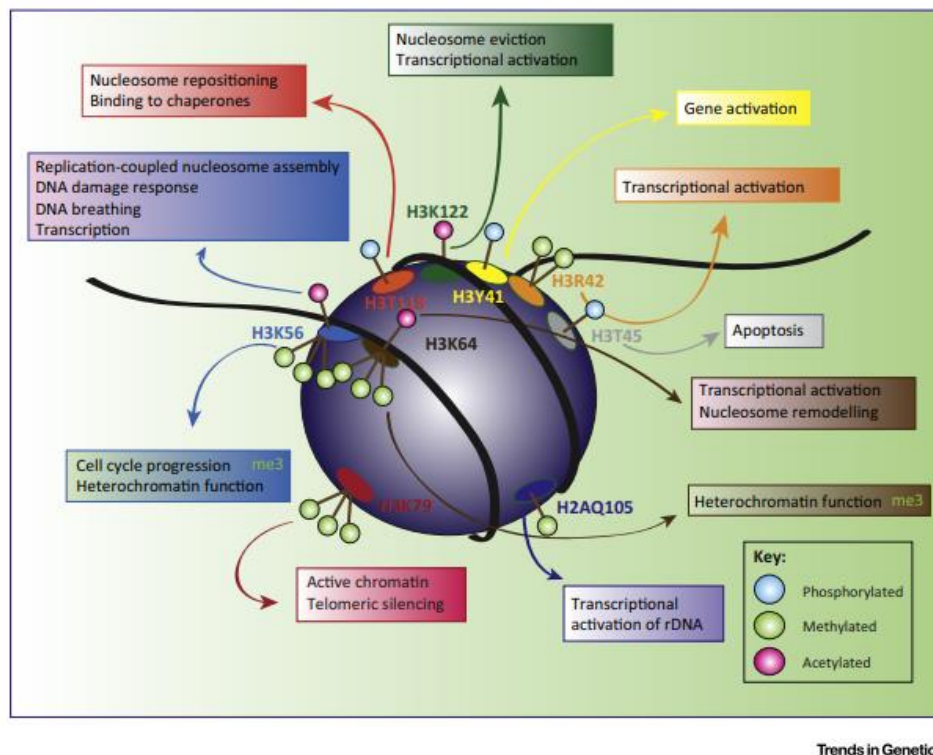
1.8 Epigenética: potenciales vías accionables para el desarrollo de terapias futuras

La epigenética estudia los mecanismos que regulan la expresión genética sin que exista una modificación en la secuencia del ácido desoxirribonucleico (ADN). Cada célula diploide humana contiene aproximadamente 2 mil millones de pares de bases de ADN (73), que debe estar accesible cuando sea necesario, por ejemplo, para la transcripción o replicación celular (74). Durante mucho tiempo, el ADN fue considerado el único depósito de material heredable en la célula, pero actualmente sabemos que los cambios epigenéticos son capaces de regular la transcripción. En gliomas, los descubrimientos en la última década han cambiado por completo nuestra visión de la genética y epigenética en esta enfermedad (64). De hecho, la mutación más

característica de estos tumores, y la más frecuente entre los de grado II y III, la mutación en *IDH*, es oncogénica a través de importantes cambios epigenéticos.

El ADN se almacena y organiza como cromatina dentro del núcleo celular. Esta organización comienza con la envoltura del ADN alrededor de un complejo de proteínas octaméricas histonas (75) formando los nucleosomas. Las histonas son propensas a sufrir modificaciones tales como metilación, acetilación o fosforilación. La cromatina actúa por tanto como una plataforma dinámica de integración y almacenamiento de señales (76) (Figura 9). El escenario epigenómico resultante determina la accesibilidad de los elementos reguladores modulando la transcripción (77). La metilación del ADN y modificaciones de las histonas producen cambios en la expresión génica celular. Existe, por tanto, una relación estrecha entre genoma y epigenoma. Es importante entender que estos mecanismos de regulación epigenética están implicados en procesos fisiológicos y patológicos como especificidad de tejido y carcinogénesis, respectivamente (77). La glioma-génesis involucra tanto a alteraciones genéticas como epigenéticas (76).

Figura 9. Esquema de un nucleosoma: ADN bicatenario rodeando el octámero de histonas. Detalla las modificaciones en las histonas: residuos fosforilados (azul claro), metilados (verde) y acetilados (rosa).



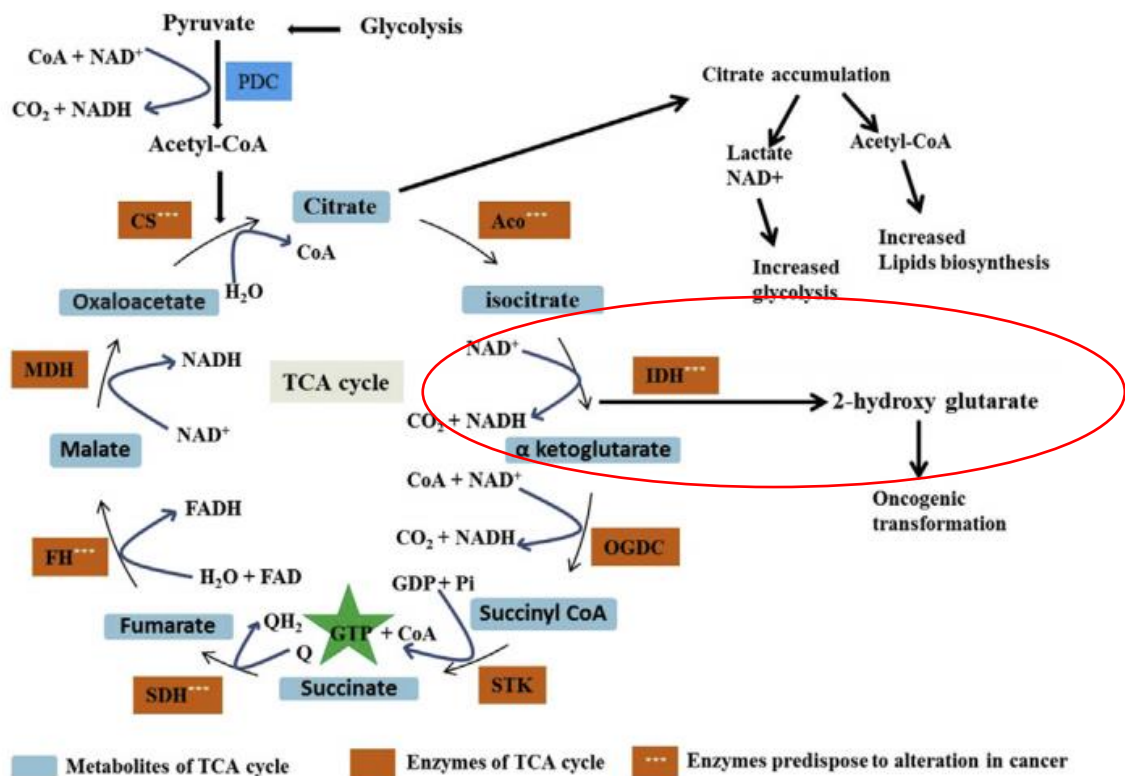
Trends in Genetics

Fuente: Lawrence M, et al. *Lateral Thinking: How Histone Modifications Regulate Gene Expression* (74).

Cada vez existe mayor evidencia acerca de que la activación de vías oncogénicas dentro de las propias células tumorales puede llevar a la modulación del MT que las rodea. Esta modulación puede traducirse en una mayor o menor respuesta a terapias inmunes. Sabemos que la presencia de linfocitos T CD8⁺ en el ambiente tumoral favorece la respuesta a la inmunoterapia. Los análisis moleculares de tumores con gran y escaso infiltrado linfocitario (CD8⁺) indican que la activación de vías oncogénicas dentro de las células tumorales puede estar relacionada con la inducción o evasión de la respuesta inmune antitumoral. En el caso de algunas neoplasias (pulmón o melanoma entre otras), el estudio de distintas localizaciones metastásicas en un mismo paciente ha mostrado que en ocasiones coexisten lesiones con perfil inflamado por la presencia de células T y lesiones carentes de infiltrado inmune. Esto sugiere que características propias de los mismos sitios de metástasis pueden causar defectos en la infiltración por células T (78-80).

La interacción recíproca entre célula tumoral y célula huésped tiene también control epigenético. Sin embargo, actualmente, todavía sabemos poco acerca de cómo la desregulación epigenética impacta en la aparición y progresión tumoral. En los gliomas sabemos que existen factores intrínsecos de las células tumorales que contribuyen al fenotipo de tumor frío. En estos tumores resulta necesario entender mejor la regulación de la respuesta inmune, así como su posible asociación al perfil molecular y epigenético. Un mayor conocimiento al respecto nos puede llevar a encontrar moléculas predictoras de respuesta a la inmunoterapia o incluso nuevas dianas terapéuticas. Para entender la importancia de los mecanismos epigenéticos en el desarrollo tumoral en los gliomas con mutación de *IDH* es importante hacer referencia al papel del Ciclo del Ácido Tricarboxílico (ciclo TCA) o Ciclo de Krebs. Esta es la principal vía metabólica para la obtención de energía en las células eucariotas. Tiene lugar en la matriz mitocondrial donde se produce la oxidación de la glucosa. Los cambios genéticos y epigenéticos de las enzimas del Ciclo de Krebs pueden llevar a la producción de onco-metabolitos impulsores de la patogénesis y progresión del tumor (81) (Figura 10). Ya en el año 1956, Otto Warburg, fisiólogo alemán, reportó en uno de sus trabajos que las células cancerosas tenían características metabólicas distintas a las células normales (82).

Figura 10. Alteraciones en las enzimas y metabolitos del Ciclo de Krebs asociadas con la carcinogénesis.



Fuente: Sajjani K, et al. Genetic alterations in Krebs cycle and its impact on cancer pathogenesis (81).

Respecto a la mutación de *IDH* en gliomas: *IDH 1-2* son enzimas que catalizan la conversión de isocitrato en α -cetoglutarato produciendo nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH). En su forma mutada *IDH1-2* pierden su actividad enzimática normal y adquieren la habilidad de producir 2-HG, que inhibe competitivamente las enzimas dependientes de α -cetoglutarato con papeles cruciales en la regulación génica y de homeostasis tisular. Asimismo, la mutación de *IDH* altera la diferenciación celular tumoral. La acumulación de 2-HG en el interior de la célula de glioma deteriora, entre otras, la actividad de histonas demetilinas de ADN dependientes de α -cetoglutarato. Esto conduce a la hipermetilación global con la consecuente alteración de la diferenciación celular y menor supervivencia celular de las células tumorales *IDH1-2* mutadas. Además, las células *IDH* mutadas tienen niveles basales de NADH más bajos, lo que hace que la célula tumoral mutante sea más vulnerable a la muerte celular. La traducción clínica de todo lo anterior es que los pacientes con gliomas *IDH1-2* mutados presentan mejores supervivencias en relación con la mayor vulnerabilidad de las células de glioma en comparación con los *IDH* w/t.

Resumiendo, las alteraciones en el Ciclo de Krebs así como los onco-metabolitos generados son de gran importancia en la patogénesis de múltiples cánceres (77), incluidos los gliomas debido a la mutación de *IDH* que tan frecuente es en ellos. Esto supone un importante campo científico para el desarrollo de terapias oncológicas dirigidas en tumores para los que, hasta la fecha, existen pocas opciones terapéuticas.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

Los gliomas son tumores en los que existe una respuesta inmune ineficaz y en los que las células inflamatorias juegan, paradójicamente, un papel inmunosupresor. Sabemos además que estos tumores están sometidos a una fuerte regulación epigenética que implica cambios en el curso clínico de la enfermedad. Los gliomas *IDH1/2* mutados muestran mayor SG que los *IDH1/2* w/t y esta mutación constituye un evento temprano en el desarrollo tumoral con importantes cambios en la metilación del ADN. Aunque las implicaciones clínicas están bien descritas, falta mucho por saber sobre los mecanismos a partir de los cuales estas mutaciones generan tales diferencias.

La hipótesis de este trabajo es que diferencias en el perfil molecular de los gliomas podrían generar escenarios inmunológicos distintos con las consiguientes implicaciones clínicas en los pacientes con glioma. En concreto, proponemos que tumores con o sin mutaciones en *IDH1/2* presentan cambios en las células inflamatorias presentes en el MT y, en el futuro, podría condicionar un abordaje terapéutico diferente. Cambios en el infiltrado inmune de los gliomas podrían suponer una respuesta diferencial a fármacos activadores de la inmunidad, como los anticuerpos anti PD-1 o anti PD-L1, asociados a distintos perfiles moleculares. Hasta la fecha, la inmunoterapia no ha demostrado beneficio en los gliomas. Un mejor conocimiento del infiltrado inmune podría ayudar a plantear enfoques terapéuticos novedosos asociando la actividad de los fármacos anti PD-1 y anti PD-L1 con agentes desmetilantes o inhibidores de *IDH*.

¿Cómo es el microambiente inmunológico en los gliomas?, ¿Qué tipos celulares son relevantes en este ambiente inmunosupresor?, ¿Son las células del infiltrado inmune diferentes en los *IDH1/2* mutados respecto a los *IDH* w/t?. Estas son algunas de las cuestiones sobre las cuales se fundamenta el presente trabajo.

2.2 Objetivos

El objetivo global es describir las diferencias en el MT según el estado mutacional de *IDH* en gliomas de reciente diagnóstico intervenidos. De acuerdo con lo anterior este trabajo tiene como objetivos específicos:

1. Conocer la diferente evolución clínica de los gliomas en función del estado de *IDH* y de las características del MT que los envuelve.
2. Definir subgrupos específicos atendiendo a las diferencias de las células inflamatorias del MT.
3. Caracterizar cuantitativa y cualitativamente las células inflamatorias presentes en muestras de pacientes recién diagnosticados de glioma de distintos grados y relacionarlo con el perfil molecular en función del estado de *IDH*.
4. Estudiar la expresión de PD-L1, molécula clave en el control inmune tumoral, en las células tumorales de gliomas de distintos grados así como en las células mieloides del infiltrado que las rodea.
5. Describir las poblaciones inmunes en sangre periférica al diagnóstico del glioma y analizar la relación con el infiltrado tumoral y factores clínicos y moleculares que pudieran apoyar su utilidad como marcadores pronóstico.

3. PACIENTES Y MÉTODOS

3 PACIENTES Y MÉTODOS

3.1 Selección de pacientes

Realizamos un estudio prospectivo incluyendo pacientes adultos intervenidos en el Servicio de Neurocirugía del Hospital Universitario Doce de Octubre de glioma de cualquier grado de reciente diagnóstico. Se incluyeron pacientes desde febrero de 2018 hasta noviembre de 2019. Todos los pacientes fueron informados de los procedimientos y objetivos del estudio y se solicitó su consentimiento informado por escrito para participar en el mismo, los pacientes se llevaron copia firmada del consentimiento informado. La muestra tumoral fue obtenida de la primera cirugía. Debido a que la prioridad de la muestra fue el diagnóstico histológico, se excluyeron los pacientes que iban a someterse a biopsia y no a resección de la lesión, o aquellos en los que no era factible obtener tejido suficiente para realizar las determinaciones requeridas. Se recogió el material de un total de 29 pacientes que se caracterizaron por citometría según la presencia de infiltrado inmune alto vs. bajo. Hubo 4 fallos de selección (fallos de screening). De los 29 pacientes incluidos se llevó a cabo un análisis más completo del infiltrado en 26 pacientes, para este análisis se descartaron 3 muestras por escasez de celularidad y calidad de la muestra tumoral.

3.2 Recogida de datos

De manera prospectiva se recogieron las variables clínicas, histológicas, moleculares y radiológicas necesarias (Material Suplementario, 7.1. Base de datos). Se obtuvo también una muestra de sangre periférica para el estudio de la celularidad inmune previo a cirugía del tumor. Fueron incluidos gliomas con y sin mutación *IDH1/2*. Todo el tejido biológico se registró y almacenó en el archivo y banco de tumores del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Doce de Octubre. El diagnóstico histológico se realizó siguiendo la clasificación de tumores de SNC OMS 2016 que era la que regía en el momento de desarrollo del estudio (12). Se recogieron prospectivamente los siguientes parámetros clínicos: edad al diagnóstico, sexo, tipo de intervención quirúrgica (resección parcial o completa) según el resto tumoral definido en la RMN postoperatoria de rutina, índice de *Karnofsky Performance Status* (KPS) posterior a la cirugía, diagnóstico y grado tumoral, tratamiento recibido en primera línea, tiempo hasta progresión (en meses), tiempo de seguimiento (en meses) y estado del paciente en el último seguimiento. Los pacientes fueron tratados según el estándar de tratamiento del glioma en cuestión, reflejado en las guías de diagnóstico y tratamiento del Grupo Español de

Investigación en Neurooncología (GEINO) (8,83,84). En todos los casos incluidos la intención terapéutica era aplicar el estándar después de la recuperación quirúrgica, pero en un caso no pudo administrarse el tratamiento programado por deterioro clínico antes de comenzar el tratamiento complementario.

3.3 Métodos

Con el objetivo de investigar el infiltrado inmune asociado a tumor en gliomas de distintos grados, hemos llevado a cabo una caracterización de los tumores por citometría de flujo y correlacionado esta información con el perfil molecular y el análisis histológico de cada tejido. La muestra tumoral se obtenía de la primera cirugía de resección del glioma. El día de la resección, previo a la cirugía, se extraía una muestra de sangre periférica para el estudio de poblaciones linfoides y mieloides en sangre.

3.3.1 Análisis por citometría de Flujo

Se obtuvieron suspensiones de tumor después de la desagregación mecánica seguida de la desagregación enzimática con Accumax (X) 15 min a temperatura ambiente. Las suspensiones celulares se filtraron a través de un filtro celular de malla de nylon de 70 micrómetros (μm) (Fisher Scientific, Waltham, MA) y los eritrocitos se lisaron con tampón Quicklysis (Cytognos). Las células se incubaron con bloqueo de hFcR (Miltenyi). Luego, se incubaron suspensiones durante 20 minutos a 4 grados centígrados ($^{\circ}\text{C}$) con anticuerpos directamente conjugados diluidos en PBS (*Phosphate Buffered Saline*) 1% de FBS (*Fetal Bovine serum*). Se realizó una tinción para la detección de viabilidad (*Fixable Viability Stain*, (Becton Dickinson)) durante 20 minutos a temperatura ambiente (TA) en la oscuridad y las células muertas se excluyeron en el análisis por citometría.

El análisis se realizó en una citometría de flujo Macsquant10 (Miltenyi). Los anticuerpos específicos para el análisis se describen en la Tabla 2 (Figura 11). La definición de algunos de los subconjuntos fue:

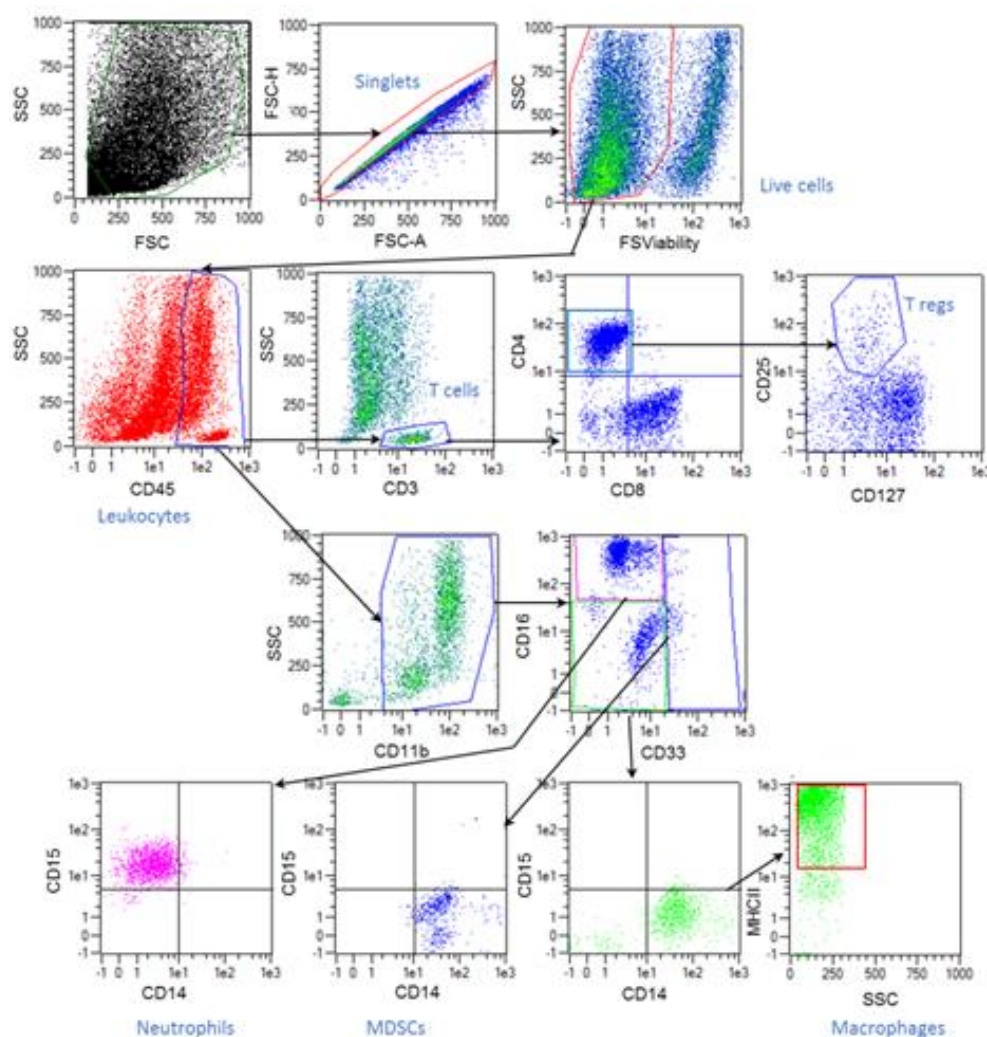
- Neutrófilos: CD45 + CD11b + CD16 + CD15 + CD14-CD33-. MDSC: CD45 + CD11b + CD16 + CD15-CD14 +/- CD33 +.
- Macrófagos: CD45 + CD11b + CD16-CD15-CD14 +/- CD33-MHCII +.
- Tregs: CD45 + CD3 + CD4 + CD127lo.

Tabla 2. Anticuerpos específicos para el análisis por citometría.

Técnica	Antígeno	Conjugación	N.º de catálogo	Casa comercial	Clon
FACS	cd25	421	302629	Biolegend	BC96
	cd3	vg	563109	BD	UCHT1
	cd45	488	130-080-202	Miltenyi	REA747
	cd127	pe	561028	BD	HIL-7R-M21
	cd8	pecy5	565310	BD	SK1
	cd4	647	300520	Biolegend	RPA-T4
	pd1	421	562516	BD	EH12.1
	cd16	421	302037	Biolegend	3G8
	cd14	pe	130-110-577	Miltenyi	REA599
	cd15	vg	301910	Biolegend	HI98
	cd33	pecy5	366615	Biolegend	P67.6
	cd11b	647	130-098-087	Miltenyi	M1/70
	pdl1	vg	329713	Biolegend	29E.2A3
	cd206	pecy5	321121	Biolegend	15-2
	mhcii	421	562805	BD	G46-6

FACS: *Fluorescence-Activated Cell Sorting*.

Figura 11. Ejemplo representativo del esquema de separación mediante portales de las distintas poblaciones inmunes analizadas sobre la suspensión de células obtenidas de los distintos gliomas.



3.3.2 Western Blot

El extracto de proteína se generó por desagregación mecánica de una parte del tejido tumoral utilizando tampón de lisis (Tris 50 milimolar (mM) (pH 7,5)), Cloruro de sodio (NaCl) 300 mM, *sodium dodecyl sulfate* (SDS) al 1% y Triton X-100 al 1% durante 15 minutos con agitación y a 95 ° C. Luego se centrifugó para descartar los restos de tejido insoluble. El contenido de proteínas se cuantificó utilizando el kit de ensayo de proteínas BCA (Thermo-Fisher-Scientific). Aproximadamente 20-30 microgramos (µg) de proteínas se diluyeron mediante *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) al 10% o 12% y luego se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Hybond-ECL, Amersham Biosciences). Las membranas se bloquearon durante 1 hora a TA en solución salina tamponada con Tris y ácido clorhídrico (TBS-T Tris-HCl 10 mM [pH 7,5], NaCl 100 mM y Tween-20 al

0,1%) con leche desnatada al 5%, y luego se incubaron durante la noche a 4 ° C con el anticuerpo primario correspondiente diluido en TBS-T. Los anticuerpos primarios fueron contra CD11b (1/1000, Sigma # SAB1305652), contra *Ionized Calcium Binding Adapter Protein 1* (IBA1) (1/2000 Abcam #ab16588) y contra Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (1/1000 Santa Cruz Biotech, # sc-47724). Después de lavar 3 veces con TBS-T, las membranas se incubaron durante 2 horas a TA con su correspondiente anticuerpo secundario anti-ratón o anti-conejo (Dako), conjugado con HRP (peroxidasa de rábano) y diluido en TBS-T. Las proteínas se visibilizaron por quimioluminiscencia con ECL (Pierce) (sustrato quimio luminiscente para detección por Western Blot) usando el Amersham Imager 680.

3.3.3 Inmunohistoquímica (IHQ)

Las muestras de tejido tumoral se fijaron en formol al 10% durante la noche, luego se lavaron en PBS y se deshidrataron por inmersión en baños de alcohol y xileno graduados. Luego fueron embebidas en parafina. Después de enfriar el bloque de cera, se obtuvieron secciones de 5 µm de espesor en un microtomo y luego las secciones se rehidrataron (calentar 60 ° C, Xilol, Etanol (EtOH) 100, EtOH 96, agua corriente) para la tinción con Hematoxilina-Eosina o para la inmunotinción. Antes de la inmunotinción, realizamos la permeabilización con 1% de tritón X-100 (Sigma-Aldrich) y la recuperación de antígeno con tampón de citrato (10 mM pH 6) en una olla a presión (2 minutos a la presión más alta). Se realizó un paso de inhibición de la peroxidasa endógena y un paso de bloqueo con suero de caballo para impedir el pegado inespecífico. Luego, los cortes de tejido se incubaron durante toda noche con el anticuerpo contra IBA1 (1/500 Abcam #ab16588) y contra CD34 (1/200 Dako) (4 ° C). Después del lavar el anticuerpo primario, las secciones se incubaron con anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa durante 15 minutos, se incubaron con diaminobencidina (DAB) durante 3 minutos, utilizando como control tejido sin anticuerpo primario.

3.3.4 Cuantificación- IHQ

Para la cuantificación de la tinción de IBA1, se contaron las células con tinción positiva para IBA1 en 10 laminillas aleatorias de microscopia con un aumento de 10x derivadas de la tinción de los cortes histológicos de los 26 gliomas utilizados en el análisis de citometría de flujo y descritos en el apartado de pacientes.

3.3.5 qRT-PCR

El ácido ribonucleico (ARN) se extrajo del tejido usando el kit de aislamiento de ARN (Roche). El ARN total (1µg) se transcribió inversamente con el kit reactivo PrimeScript RT (Takara). La PCR cuantitativa con transcripción inversa (qRT-PCR) en tiempo real se realizó utilizando el Light Cycler 1.5 (Roche) con SYBR Premix Ex Taq (Takara). Los cebadores utilizados para la reacción se indican para hP2RY12 FW 3'-TGCCAAACTGGGACCAGGACCA`5 y RV 3'TGGTGGCTTCTGGTAGCGATC`5. La expresión génica se cuantificó mediante el método delta- delta Ct.

3.3.6 Análisis estadístico

Se elaboró una base de datos utilizando el programa Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, EE UU) con las variables recogidas en el apartado Material Suplementario donde se aporta la versión impresa de la base de datos. Esta base de datos no contiene información relacionada con la identificación y domicilio de los pacientes. Estas variables están relacionadas con un orden numérico en otra base de datos custodiada por el director del trabajo y se destruirá una vez terminado el estudio. Para el análisis estadístico se utilizó el programa informático IBM SPSS Statics version 24 (LEAD Technologies, Chicago, Illinois, EE UU).

En el análisis del infiltrado inmune los datos cuantificados se representaron como media $\pm$ error estándar (ES), comparados entre dos grupos utilizando la prueba t de Student de dos colas. Las diferencias se presentan con significancia estadística o valor p (* p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001 y n.s: no significativo). Para el análisis de correlación entre cada proteína, los datos de expresión se probaron usando el coeficiente de correlación de Pearson (R2); Los valores de p indicados en las figuras se calcularon utilizando el programa GraphPad (GraphPad Company, San Diego, California, EE UU). Para el análisis de supervivencia, se utilizó el método de Kaplan-Meier y las pruebas de Log-Rank utilizando el programa SPSS. Se consideró la fecha de la cirugía como punto de inicio del seguimiento (fecha de diagnóstico). Se consideró como punto final el momento del fallecimiento de cada paciente, en caso de producirse o la fecha de último seguimiento en aquellos pacientes vivos al cierre de seguimiento del estudio (enero 2021). En todos los análisis de supervivencia se utilizaron Intervalos de Confianza de 95% (IC 95%). Para el análisis de celularidad inmune en sangre calculamos la media, mediana y el rango intercuartílico para las distintas células (leucocitos, neutrófilos, linfocitos y

monocitos) en cada una de los grupos a analizar. Las comparativas se realizaron mediante la prueba “t” de Student para muestras independientes teniendo en cuenta como valor de significación $p < 0,05$. Además de utilizar los valores absolutos, recodificamos las variables de recuentos celulares pre-cirugía a variables dicotómicas poniendo el punto de corte en la mediana de cada una de ellas (mediana para cada uno de los tipos celulares analizados: leucocitos 9100/mm³, neutrófilos 5900/mm³, linfocitos 1600/mm³, monocitos 600/mm³). Realizamos con esto un estudio de la asociación con variables cualitativas (como grado tumoral, estado de *IDH*, infiltrado inmune y género del paciente) mediante el test Chi-Cuadrado. Se aceptó el valor $p < 0,05$ como significativo.

3.3.7 Recogida de datos para el análisis de poblaciones inmunes en sangre

Se recogieron los datos en valor absoluto de leucocitos, neutrófilos, monocitos y linfocitos en sangre periférica. La recogida se llevó a cabo previo a la cirugía y diagnóstico histológico del tumor, es decir, cuando no se había reseado la lesión. Los datos se recogieron a partir de la analítica realizada de rutina para planificar la intervención por el Servicio de Anestesia o la analítica de entrada en urgencias. Se buscó el momento de extracción de las muestras de sangres cuando los pacientes todavía no habían recibido corticoides orales o intravenosos, este dato es importante ya que las dosis altas de dexametasona utilizadas a menudo como antiinflamatorio, pueden aumentar los leucocitos en sangre periférica. Este es uno de los efectos secundarios conocidos de dicho fármaco. Elaboramos una base de datos con el programa Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, EE UU) donde quedaban recogidos los datos acerca de edad, sexo, grado de resección, diagnóstico y grado histológico, perfil mutacional y recuento en valor absoluto de leucocitos, neutrófilos, monocitos y linfocitos en la analítica previa a cirugía. Las variables estudiadas se encuentran recogidas en el apartado material suplementario.

4. RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Características de los pacientes

La población incluida tenía una edad media de 53 años, y una mediana de 52 con rango de edades entre los 30 y los 80 años. De los 29 pacientes incluidos 13 fueron mujeres (45%) y 16 hombres (55%). En la mayoría de pacientes se llevó a cabo una resección completa del tumor (24 de 29) y solo en 5 pacientes una resección parcial. Cerca del 70% de pacientes presentaban un *Karnofsky Performance Status* (KPS) entre 90-100 tras la cirugía. Los pacientes fueron tratados según el estándar de tratamiento del glioma diagnosticado. La Tabla 3 detalla el tratamiento estándar postquirúrgico en función de la histología y grado tumoral.

Los tumores se clasificaron en base a la histología (GBM vs. LGG) y en base al estado mutacional de *IDH*. Se incluyeron 9 pacientes dentro del grupo de LGG: 3 oligodendrogliomas grado II y 6 astrocitomas grado III. Los 20 pacientes restantes correspondían a GBM grado IV. La mayoría de LGG eran *IDH* mutados (7 de 9) mientras que solo 3 de 20 GBM presentaban mutación en *IDH*. Se estudiaron otros aspectos moleculares como *ATRX* que estaba mutado en 8 pacientes y *TERT* que estaba mutado en 18 pacientes siendo la alteración observada más frecuente: *C228T*. El estatus de *MGMT* también fue estudiado, pero solo se pudo determinar en 23 de los 29 pacientes incluidos: 21 de los cuales presentaban metilación del promotor de *metil-guanina-O6-DNA metiltransferasa*; los 2 restantes no. Es importante señalar que esta alteración no condiciona cambios en el diagnóstico, pero si ha sido ampliamente reconocida como un factor predictivo para la respuesta a agentes quimioterápicos alquilantes como TMZ.

El 76% recibió tratamiento con RT y quimioterapia con TMZ según el esquema Stupp. El 7% de los pacientes recibieron tratamiento con RT seguida del esquema de quimioterapia con 3 fármacos en combinación: procarbazona, lomustina y vincristina (PCV). Un 14% de los pacientes no recibieron tratamiento tras la cirugía en algunos casos por complicaciones y deterioro global tras la intervención y en otros por rechazo del tratamiento por parte del paciente. En uno de los oligodendrogliomas grado II incluidos, el tratamiento con RT + PCV tras la cirugía no estaba indicado por no presentar ninguno de los factores pronósticos de Pignatti (edad mayor de 40 años al diagnóstico, histología de astrocitoma, diámetro ≥ 6 cm, tumor que cruza la línea media y presencia de déficit neurológico).

Tabla 3. Tratamiento postquirúrgico estándar para los distintos gliomas en función de histología y grado tumoral.

Histología	Grado	Tratamiento complementario tras cirugía
Oligodendroglioma	II	Factores pronósticos de Pignatti: No presenta → no precisa tratamiento complementario Si presenta → RT (45-54 Gy) + PCV x 6 ciclos
Oligodendroglioma	III	RT (45-54 Gy) + PCV x 6 ciclos
Astrocitoma	I (pilocítico)	No precisa tratamiento complementario tras cirugía
Astrocitoma	II	RT (45-54 Gy) + PCV x 6 ciclos
Astrocitoma	III	RT (45-54 Gy) - TMZ + TMZ x 12 ciclos
Astrocitoma	IV (GBM)	RT (60 Gy)- TMZ+ TMZ x 6 ciclos

*Factores pronóstico de Pignatti: edad mayor de 40 años al diagnóstico, histología de astrocitoma, diámetro ≥ 6 cm, tumor que cruza la línea media y presencia de déficit neurológico.

*PCV: Procarbazina Días 8-21: 60mg/m², VO, cada 6 semanas + CCNU (Lomustina), Día 1: 110 mg/m², VO, cada 6 semanas + Vincristina Días 8 y 29: 1,4 mg/m² IV, cada 6 semanas.

*TMZ: la dosis de TMZ durante el tratamiento con radioterapia es de 75 mg/m²/día continuo hasta el fin de RT. Tras el fin de RT: TMZ 200 mg/m²/día x 5 días en ciclos de 28 días.

Respecto al seguimiento de supervivencias la base de datos se cerró en enero 2021. La mediana de seguimiento fue de 13,8 meses. El tiempo mínimo de seguimiento tras cirugía fue 1 mes y el máximo 30 meses. Hubo 1 pérdida de seguimiento de un paciente diagnosticado de GBM *IDH w/t* que se trasladó a su país de origen tras el diagnóstico del tumor. De los 29 pacientes incluidos 14 progresaron durante el tiempo de seguimiento del estudio. Esto significa que un 48% de los pacientes incluidos presentaron progresión de la enfermedad tumoral. La mediana de tiempo hasta la progresión de todos los pacientes incluidos fue de 17,5 meses. El análisis detallado de supervivencia en función de las características histológicas, moleculares y el infiltrado inmune tumoral se detalla en el apartado de Resultados 4.4.

Las características de los 29 pacientes diagnosticados de glioma e incluidos en el estudio se detallan en la Tabla 4 y la Tabla 5.

Tabla 4. Características de los pacientes incluidos.

	Edad	Sexo	Grado de resección	Histología	Grado	IDH	ATRX	MGMT	TERT	Infiltrado Inmune	Primera línea	Tiempo seguimiento	PD	Estado tras F/U	SLP	OS
G001	82	mujer	Completa	Astrocitoma	IV	wt.	wt.	metilado	C228T	hi	Stupp	7,3	si	exitus	4,6	7,4
G002	36	mujer	Completa	Astrocitoma	IV	Mut.	Mut.	metilado	wt.	lo	Stupp	30	no	vivo	30,4	35
G003	68	hombre	Completa	Astrocitoma	IV	wt.	Mut.	metilado	wt.	hi	Stupp	15	si	exitus	8,3	15,2
G004	42	hombre	Completa	Astrocitoma	IV	Mut.	Mut.	metilado	wt.	lo	Stupp	6	si	exitus	4,4	5,6
G005	70	hombre	Completa	Astrocitoma	IV	wt.	wt.	metilado	C228T	lo	ninguno	4,6	UN	exitus	4,7	4,7
G006	57	hombre	Completa	Astrocitoma	IV	wt.	wt.	metilado	C228T	lo	ninguno	1	UN	UN	1,1	1,1
G007	34	mujer	Completa	Astrocitoma	IV	wt.	wt.	metilado	wt.	hi	Stupp	27	no	vivo	27,4	31,8
G010	30	mujer	Completa	Astrocitoma	III	Mut.	Mut.	metilado	wt.	lo	Stupp	26,5	no	vivo	27	31,1
G011	52	hombre	Completa	Astrocitoma	IV	wt.	wt.	no metilado	C228T	hi	Stupp	24,8	si	exitus	17,6	25,2
G012	53	hombre	Parcial	Astrocitoma	IV	wt.	wt.	metilado	C228T	lo	Stupp	13,6	si	exitus	6,8	13,8
G014	30	mujer	Parcial	Oligodendroglioma	II	Mut.	wt.	metilado	C228T	lo	RT+PCV	29,2	no	vivo	25,3	25,3
G020	46	hombre	Completa	Oligodendroglioma	II	Mut.	wt.	metilado	C228T	lo	RT+PCV	27,2	no	vivo	23,5	27,9
G021	55	mujer	Completa	Astrocitoma	IV	wt.	wt.	metilado	wt.	hi	Stupp	13,9	si	exitus	6,7	14,1
G023	45	mujer	Completa	Astrocitoma	III	Mut.	Mut.	metilado	wt.	lo	Stupp	25,5	no	vivo	21,5	26
G024	35	mujer	Completa	Oligodendroglioma	II	Mut.	wt.	metilado	C228T	lo	ninguno	25,1	no	vivo	21,1	25,5
G030	63	hombre	Completa	Astrocitoma	IV	wt.	wt.	metilado	C228T	lo	Stupp	11,7	si	exitus	5,7	11,9
G035	65	mujer	Completa	Astrocitoma	IV	wt.	wt.	-	C228T	hi	Stupp	22,5	si	vivo	4,1	22,9
G036	76	mujer	Parcial	Astrocitoma	III	wt.	wt.	metilado	C228T	lo	Temozolo-mida	8,8	si	exitus	4,2	22,5
G038	39	hombre	Completa	Astrocitoma	III	Mut.	Mut.	-	wt.	lo	Stupp	21,4	no	vivo	17,6	22
G039	47	hombre	Completa	Astrocitoma	IV	Mut.	Mut.	metilado	wt.	lo	Stupp	17	no	vivo	13,9	21,4
G043	38	hombre	Parcial	Astrocitoma	III	Mut.	Mut.	metilado	C228T	lo	Stupp	20,3	no	vivo	16,2	20,6
G044	70	mujer	Completa	Astrocitoma	IV	wt.	wt.	-	C228T	hi	Stupp	18,3	si	vivo	8,7	20
G045	65	hombre	Completa	Astrocitoma	IV	wt.	wt.	-	-	hi	Stupp	14,2	si	exitus	11	14,4
G048	69	mujer	Completa	Astrocitoma	IV	wt.	wt.	-	C228T	hi	Stupp	18,9	si	vivo	9,5	19,2
G054	42	hombre	Completa	Astrocitoma	IV	wt.	wt.	-	wt.	lo	Stupp	18,1	no	vivo	13,9	18,3
G055	71	mujer	Parcial	Astrocitoma	IV	wt.	wt.	metilado	C228T	hi	ninguno	4,5	si	exitus	0,33	4,5
G058	70	hombre	Completa	Astrocitoma	IV	wt.	wt.	metilado	C250T	lo	Stupp	15,7	no	vivo	11,8	15,9
G059	50	hombre	Completa	Astrocitoma	III	wt.	wt.	no metilado	C228T	lo	Stupp	15,5	no	vivo	11,3	15,7
G060	50	hombre	Completa	Astrocitoma	IV	wt.	wt.	metilado	C228T	hi	Stupp	15,4	no	vivo	11,3	15,7

Lo: low infiltrate; hi: high infiltrate; PD: progression disease; F/U: Follow up; UN: unknown.

Tabla 5. Características clínico-patológicas de la población a estudio.

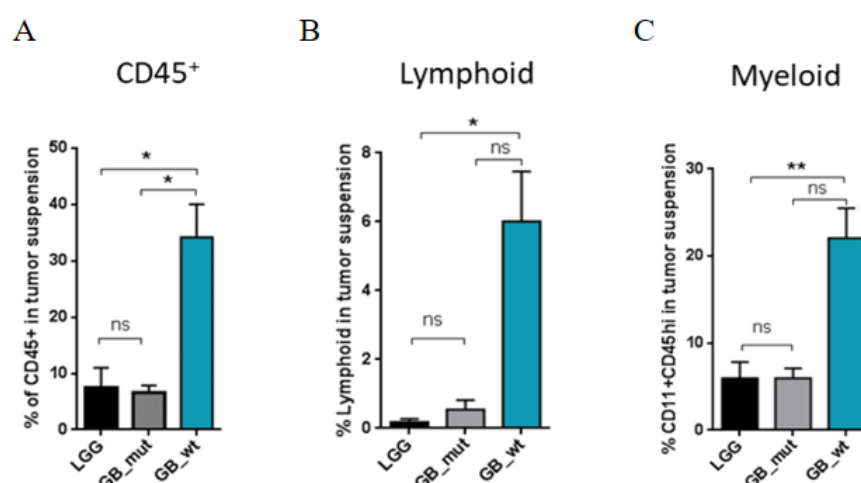
N	29
Edad (años)	
Media	53,4 años
Mediana	52 años
Rango	30-82 años
Sexo	
Mujer	N= 13; 45%
Hombre	N= 16; 55%
Grado de resección tumoral	
Completa/subtotal	N= 24; 83%
Parcial	N= 5; 17%
KPS tras cirugía	
100	N= 11; 38%
90	N= 9; 31%
80	N= 4; 14%
≤ 70	N= 5; 17%
Diagnóstico Histológico	
Astrocitoma	N= 26; 90%
Oligodendroglioma	N= 3; 10%
Grado de tumor	
II	N= 3; 10%
III	N= 6; 21%
IV	N= 20; 69%
IDH 1/ 2	
Mutado	N= 10; 34%
w/t	N= 19; 66%
ATRX	
Mutado	N= 8; 28%
w/t	N= 21; 72%
MGMT	
Metilado	N= 21; 72%
No metilado	N= 2; 7%
No conocido	N= 6; 21%
TERT	
Mutado	N= 18; 62%
w/t	N= 10; 34%
No conocido	N= 1; 3%
Tratamiento de 1ª línea	
Stupp (RT + TMZ)	N= 22; 76%
TMZ	N= 1; 3%
RT	N= 0; 0 %
RT+PCV	N= 2; 7%
Ninguno	N= 4; 14%
Progresión de la enfermedad	
Si	N= 13; 48%
No	N= 14; 45%
No conocido	N= 2; 7%
Exitus	
Si	N= 11; 38%
No	N= 17; 59%
No conocido	N= 1; 3%

4.2 Identificación de diferentes subgrupos de gliomas según el perfil inmune

Las muestras, procedentes de la resección quirúrgica, fueron disociadas y analizadas por citometría de flujo. La estrategia de activación para caracterizar las distintas poblaciones inmunes se detalla en la Figura 11. Se observó un incremento significativo del número de células CD45⁺ en los GBM *IDH* w/t (GB_wt) en comparación con los tumores con mutación en *IDH*, tanto GBM (GB_mut) como LGG. Como se ilustra en el Gráfico 1, el aumento de células se observó tanto en el componente linfóide como en el componente mieloide del infiltrado inmune.

Gráfico 1. Caracterización del infiltrado inmune por citometría de flujo.

A) porcentaje de CD45⁺. **B)** porcentaje linfóide (CD45⁺CD11b⁻). **C)** porcentaje mieloide (CD45⁺CD11b⁺) del infiltrado inmune. ns, no significativo; *, p<0,05; **, p<0,01.

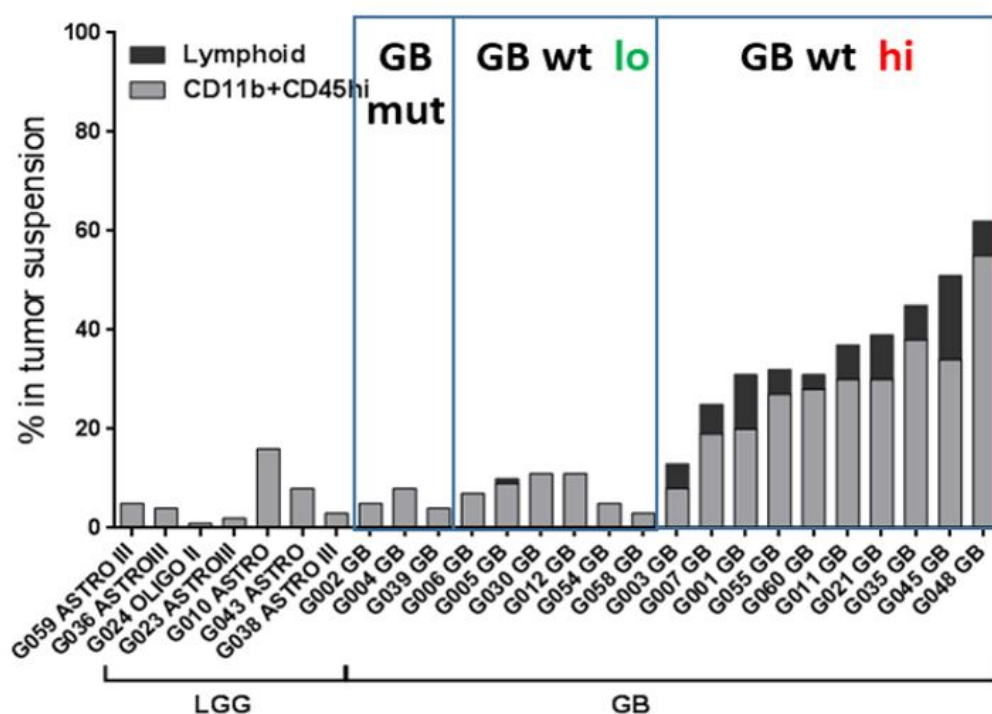


El análisis de los datos de cada tumor de forma individual confirmó que los gliomas *IDH* mutados contienen menos células inmunes en el infiltrado tumoral independientemente del grado de tumor (Gráfico 2). Dentro del grupo de tumores GBM *IDH* w/t, identificamos un subgrupo con bajo contenido de células CD45⁺ (menos del 15% de la suspensión celular) a las que denominamos como GBMwt_lo, con un porcentaje muy similar de células inmunes al observado en los tumores *IDH* mutados (ya sea LGG o GBM) y muy diferente del otro grupo de GBM *IDH* w/t (al que denominamos GBMwt_hi), donde las células CD45⁺ representan casi el 50% del contenido del tumor. Es decir, en el análisis por citometría se han detectado tres grupos diferentes: los gliomas con mutación de *IDH* (*IDH1/2* mut); los GBM sin mutación de *IDH* pero con una

población linfocítica muy elevada (GBMwt_hi) y luego una población de GBM sin mutación de *IDH* pero con una población linfocitaria baja, similar a lo encontrado en los gliomas con mutación de *IDH*.

Gráfico 2. Porcentaje de poblaciones linfoides o CD11b+ CD45hi sobre la suspensión total del tumor en muestras individuales.

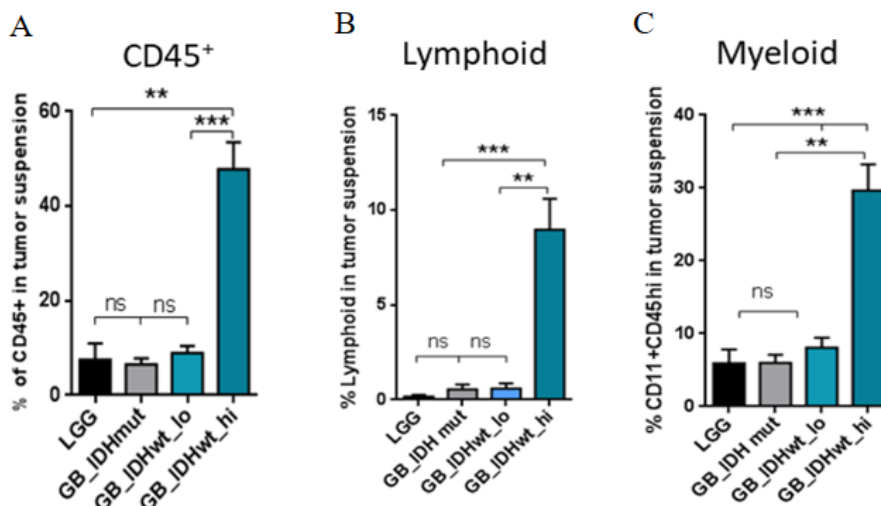
Cada barra representa un caso con el porcentaje de células en el total de la suspensión del glioma: linfocitos (negro), células mieloides CD45hi CD11b+ (gris). La suma de los dos tipos de células es la proporción de células CD45+ en la suspensión.



Como se puede ver en el Gráfico 3, el contenido de células inmunes, ya sean linfocitos o células mieloides, es mayor en el grupo de los GBMwt_hi que en el grupo GBMwt_lo o en los gliomas con mutación en *IDH1/2*. Para estudiar la celularidad inmune en los GBM separamos los gliomas de bajo grado en un cuarto grupo. En el eje horizontal del Gráfico 3 se enumeran los casos agrupados: glioma de bajo grado con mutación de *IDH1/2* (LGG *IDH1/2* mut), GBM *IDH1/2* mutados, GBM *IDHw/t_lo* y GBM *IDHw/t_hi*.

Gráfico 3. Porcentaje de células linfoides y mieloides en la suspensión tumoral total para los distintos subgrupos de gliomas.

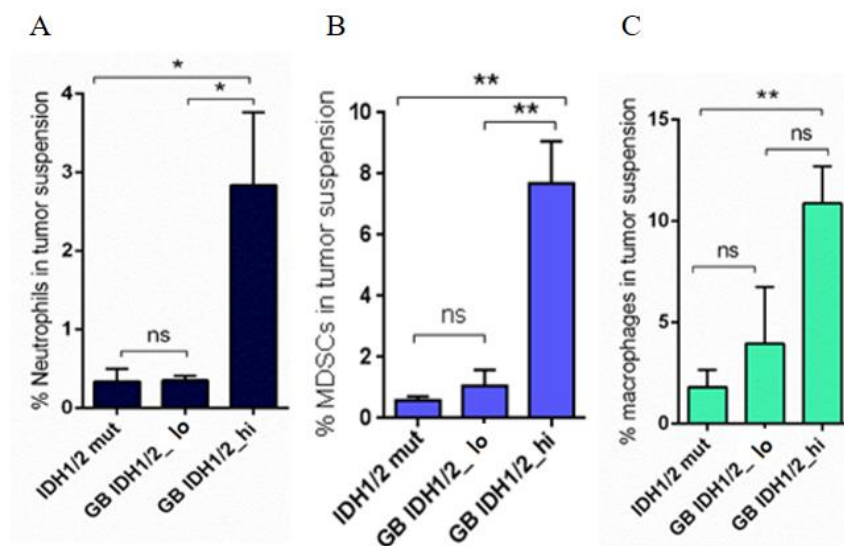
A) CD45⁺. B) Linfoides (CD45⁺CD11b⁻). C) Mieloides (CD45⁺CD11b⁺). ns, no significativo; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.



Con el objetivo de conocer mejor la composición del infiltrado inmune según el estado de *IDH* y no según el grado histológico, agrupamos los gliomas en tres subgrupos y diseccionamos el componente mieloide en la suspensión tumoral (Gráfico 4). Los resultados mostraron que el porcentaje de neutrófilos, MDSC, y macrófagos estaba incrementado en los GBMw/t_hi comparado con GBMw/t_lo y GBM *IDH* mut. Aunque el resultado en relación con los macrófagos no resultó estadísticamente significativo.

Gráfico 4. Composición del infiltrado en las suspensiones tumorales totales de los tres subgrupos.

A) Porcentaje de neutrófilos. **B)** Porcentaje de MDSCs. **C)** Porcentaje de macrófagos. ns, no significativo; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.



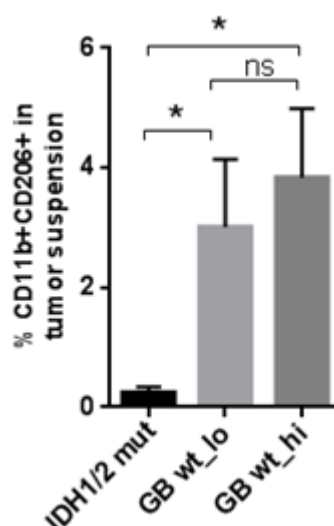
También decidimos analizar en más detalle la población de células mieloides. Los monocitos procedentes de médula ósea pueden polarizarse en fenotipos clásicamente activados, denominados macrófagos proinflamatorios (M1) o alternativamente activados, denominados macrófagos antiinflamatorios (M2) (49,50). Las células M1 producen altos niveles de metabolitos oxidativos y citocinas proinflamatorias que son esenciales para la defensa del huésped, pero que también pueden provocar daños en los tejidos sanos (51). Por otro lado, las células M2 secretan interleucinas antiinflamatorias como IL-10 que inhibe la acción citotóxica de las células T y NK. Secretan también *Insulin Growth Factor* (IGF) y promueven la regeneración de tejidos y angiogénesis (85). Los M2 están implicados en la curación de heridas y suprimen las respuestas inmunes adversas (52), mostrando acciones oncogénicas que facilitan la supervivencia y proliferación de las células tumorales.

En el análisis del infiltrado inmune encontramos una mayor proporción de células CD11b+ CD206+ en GBMw/t_lo y en GBMw/t_hi en comparación con gliomas *IDH* mutados (Gráfico 5). La presencia de este marcador es un indicativo de fenotipo M2. Estas células han sido reconocidas como macrófagos asociados al glioma con alta capacidad inmunosupresora y correlaciona con los gliomas de alto grado como se ha

descrito ampliamente para los GBM. Se considera que los TAM desarrollan un fenotipo M2 con funciones antiinflamatorias en la mayoría de los tumores de alto grado (86) se asocian con remodelado tisular y angiogénesis que podrían contribuir a la progresión tumoral (87,88) y mal pronóstico (89,90).

Gráfico 5. Porcentaje de células mieloides CD206+.

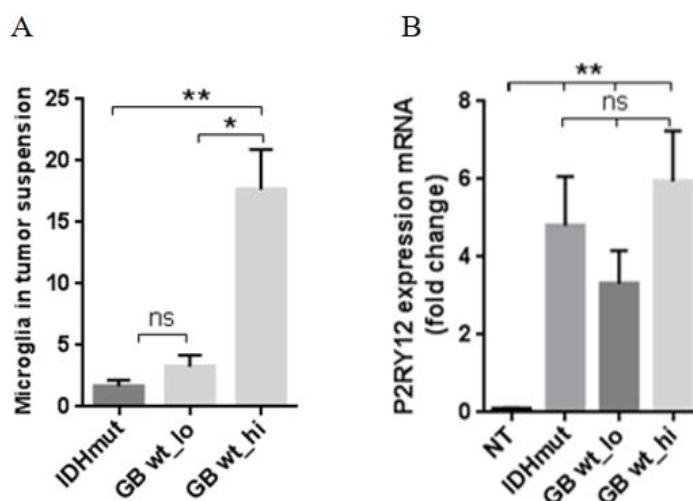
*, $p < 0,05$; ns, no significativo.



Respecto a la microglía, esta población fue discriminada en la suspensión tumoral como células CD45_dim/CD11b+. Encontramos un porcentaje más alto de estas células en los GBMw/t_hi en comparación con los otros 2 grupos (GBMw/t_lo y GBM *IDH* mutado). Como este marcaje no es muy específico de microglía y el panel no tenía marcadores más selectivos, se llevó a cabo la cuantificación de la transcripción del gen *P2RY12*, un marcador microglial altamente expresado en estas células. La cuantificación por RT-PCR de *P2RY12* mostró que existe una mayor expresión en todos los tumores en comparación con el tejido cerebral normal, aunque no hubo diferencias entre los tres subgrupos de gliomas. Estos resultados están representados en el Gráfico 6.

Gráfico 6. Análisis de la microglía en la suspensión tumoral.

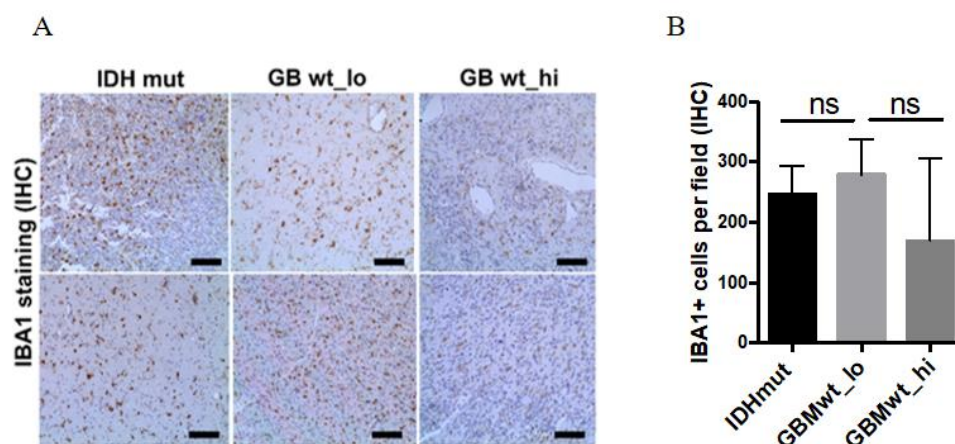
A) Células CD45_{dim}/CD11b⁺. **B)** Cuantificación de la transcripción *P2RY12* (marcador microglial). ns, no significativo; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$. NT: *normal tissue*.



Adicionalmente, se detectó por IHQ la cantidad de células microgliales positivas para *Ionized Calcium Binding Adapter Protein 1* (IBA1), que es una proteína de unión a calcio específica para microglía y macrófagos, así como la cantidad total de proteína IBA1. El resultado es que la expresión fue muy homogénea entre los diferentes subgrupos de gliomas (Gráfico 7), igual que ocurría con la expresión de *P2RY12*, pero no con los datos de citometría.

Gráfico 7. Estudio de la cantidad de células positivas para IBA1.

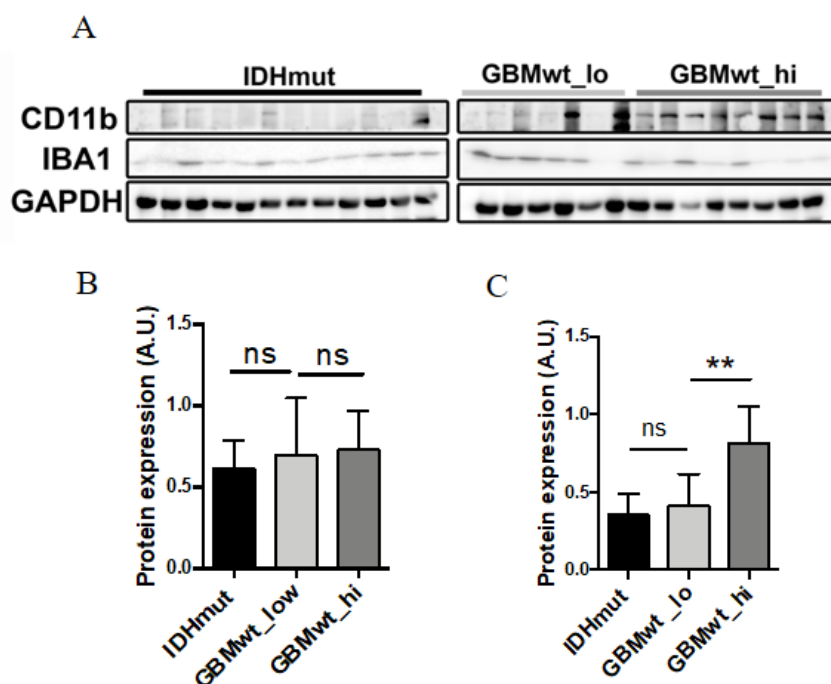
A) Imágenes de IHQ para IBA1 en los grupos de gliomas. **B)** Cuantificación de células positivas para IBA1 por campo (estudio con microscopio convencional a 20 ×). ns, no significativo.



Para obtener una evidencia independiente de la cantidad de microglía en los distintos gliomas, se realizó un análisis por Western Blot a partir del tejido tumoral fresco. En concordancia con los datos de IHQ, los niveles de proteína de IBA1 son muy homogéneos en los distintos grupos de gliomas (Gráfico 8). Sin embargo, se pudo ver un incremento de la proteína CD11b en los gliomas con alto infiltrado, lo que podría estar relacionado con su mayor contenido en macrófagos. Los datos aparentemente contradictorios entre la citometría de flujo y el análisis de proteínas de microglía probablemente reflejan la deficiencia en el proceso de disgregación del tejido para la microglía cuando se mide por citometría de flujo.

Gráfico 8. Análisis de la expresión de CD11b e IBA1.

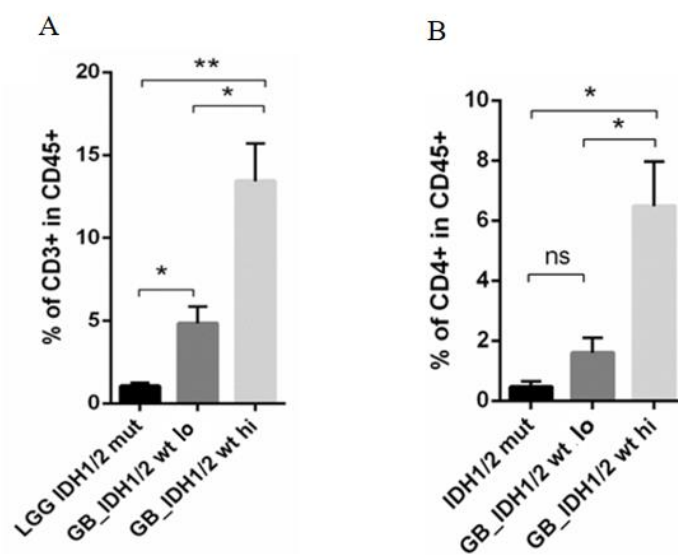
A) Western Blot en extractos de tejido tumoral de gliomas IDHmut (línea negra), GBMwt_lo (línea gris claro), GBMwt_hi (línea gris oscuro). Nivel GAPDH como control de carga. **B)** Cuantificación de los niveles de IBA1 obtenidos en el Western Blot. **C)** Cuantificación de los niveles de CD11b+ obtenidos en el Western Blot. ns, no significativo; ** $p < 0,01$.



Se realizó una caracterización del componente linfoide en los 3 subgrupos de gliomas. Observamos que la proporción de células T (CD3+), en particular el subconjunto CD4+, fue mayor en GBMwt_hi que en los otros dos subgrupos. Asimismo, al comparar el subgrupo GBMwt_lo con los *IDH* mutados, vimos que había un aumento significativo del porcentaje de células CD3+ en las células de GBMwt_lo (Gráfico 9).

Gráfico 9. Caracterización del componente linfoide en los subgrupos.

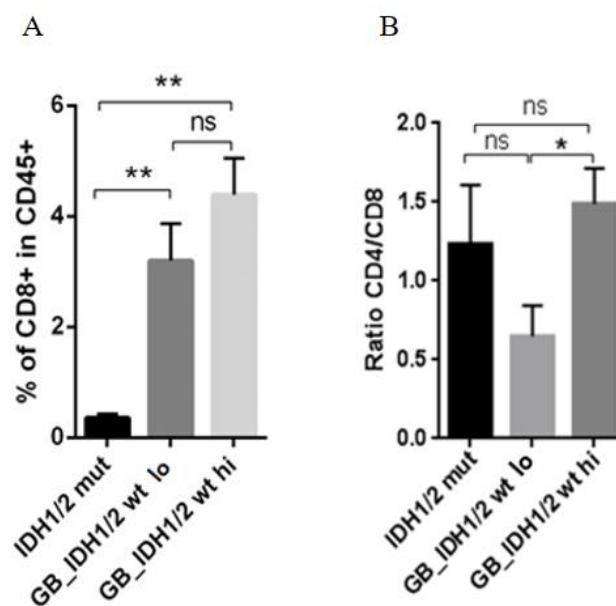
A) Porcentaje de células T CD3+. **B)** Porcentaje de células T CD4+. ns, no significativo; *, $p<0,05$; **, $p<0,01$.



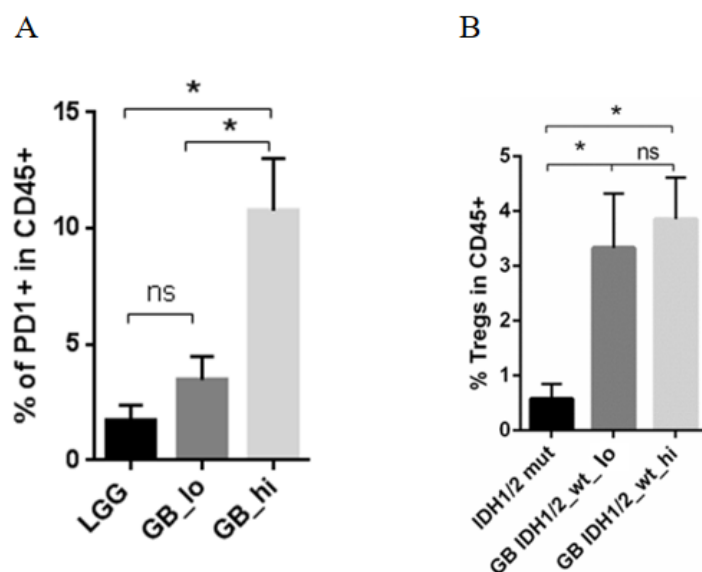
Por otro lado, no hubo diferencia entre los porcentajes de células CD8+ entre los dos subgrupos de GBM, que fue mayor en ambos subgrupos w/t que en los tumores *IDH*mut. Como resultado, la relación CD4/CD8 fue menor en los tumores GBMwt_lo en comparación con los tumores GBMwt_hi (Gráfico 10). Este ratio se ha relacionado con una adecuada función linfocitaria en otros tumores (91) y se correlaciona con un peor pronóstico en gliomas (92).

Gráfico 10. Caracterización del componente linfóide en los subgrupos.

A) Porcentaje de T CD8+. **B)** Proporción de linfocitos T CD4+/CD8+. ns, no significativo; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.



Se estudió también la proporción de células PD1+, que marca las células T exhaustas. Los resultados mostraron que la proporción era mayor en GBMw/t_hi en comparación con GBMw/t_lo, mientras que la cantidad de células T reguladoras (Tregs) fue similar en los dos subgrupos. Por el contrario, los gliomas *IDH*mut presentaban menos células T exhaustas y menos Tregs (Gráfico 11).

Gráfico 11. Análisis de células PD1+ y Tregs.**A)** Porcentaje de células PD1+. **B)** Porcentaje de Tregs. ns, no significativo; *, $p < 0,05$.

Analizando estos datos de forma conjunta cabe resaltar las importantes diferencias en el perfil inmune de los gliomas *IDHmut* frente a los *IDHw/t*, destacando que el subgrupo GBMwt_lo comparte ciertas similitudes con los gliomas *IDHmut*. Además, encontramos diferencias en el contenido y la función de los linfocitos entre los dos subgrupos de GBM, lo que podría tener consecuencias importantes en su respuesta a los anticuerpos PD-1 u otras inmunoterapias. La Tabla 6 recoge las diferencias observadas en la composición del infiltrado inmune a partir de nuestros resultados.

Tabla 6. Diferencias en la composición del infiltrado inmune en gliomas *IDH* mutados (LGG y GBM), GBMw/t_lo y GBMw/t_hi.

Las columnas en azul representan las diferencias estadísticamente significativas. Los distintos grados de significación entre los tres subgrupos de gliomas están detallados en los gráficos representados en el apartado de Resultados atendiendo al valor p (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ns, no significativo).

	IDHmut. (LGG y GBM)	GBMw/t_lo	GBMw/t_hi
Células CD45+ (linfocitos + cel. Mieloides)	bajo < 15% de la suspensión celular	bajo < 15% de la suspensión celular	alto ~ 50% de la suspensión celular
Componente mieloide (% MDSC, % neutrófilos, % macrófagos)	bajo	bajo	alto
Macrófagos CD11+ CD206+	bajo	intermedio	alto
Linfocitos T CD4+	bajo	intermedio	alto
Linfocitos T CD8+	bajo	intermedio	alto
Ratio CD4/ CD8	intermedio	bajo	alto
Células exhaustas PD1+ CD45+	bajo	intermedio/ bajo	alto
T regs	bajo	intermedio /alto	alto

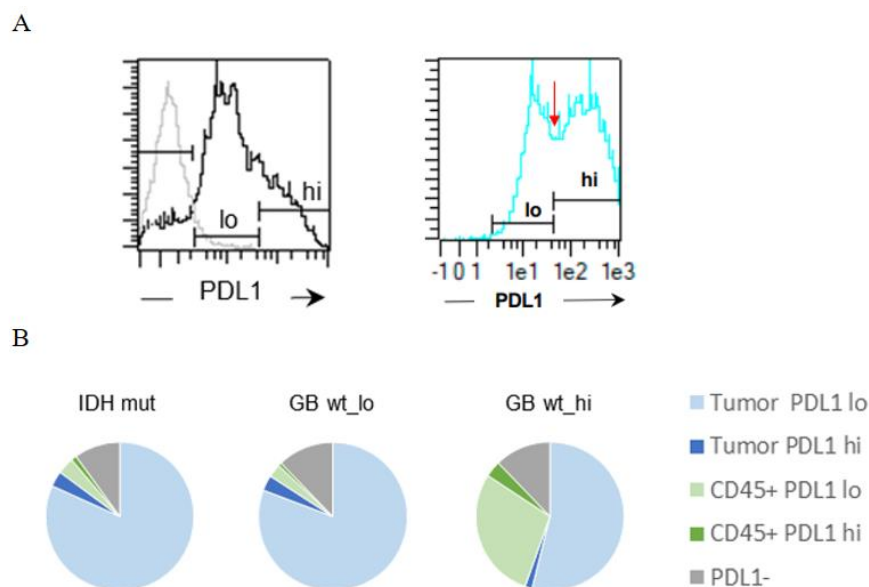
4.3 Expresión de PD-L1 en las células inmunes de los distintos subgrupos

La vía activada por el receptor PD-1 y su ligando PD-L1 constituye un mecanismo utilizado por las células tumorales para suprimir la eficacia antitumoral de los linfocitos produciendo inmunosupresión en el MT. En concreto, PD-L1 ha sido ampliamente reportado como una molécula clave de punto de control inmune en una gran variedad de tumores. Al unirse PD-L1 (expresado en las células tumorales) a PD-1 (expresado en los linfocitos) queda suprimida la proliferación y actividad de las células

T. Nuestro análisis por citometría de flujo en las muestras de glioma reveló dos niveles distintos de expresión de PD-L1. Están definidos en el Gráfico 12 como PD-L1_lo (baja expresión) y PD-L1_hi (alta expresión), tanto en células tumorales (CD45-) como en células hematopoyéticas (CD45 +). El perfil de expresión fue similar en los tumores GBMwt_lo e *IDH*mut y muy diferente en los gliomas GBMwt_hi que mostró un fuerte aumento en el porcentaje de células CD45/ PD-L1 doblemente positivas.

Gráfico 12. Expresión de PD-L1.

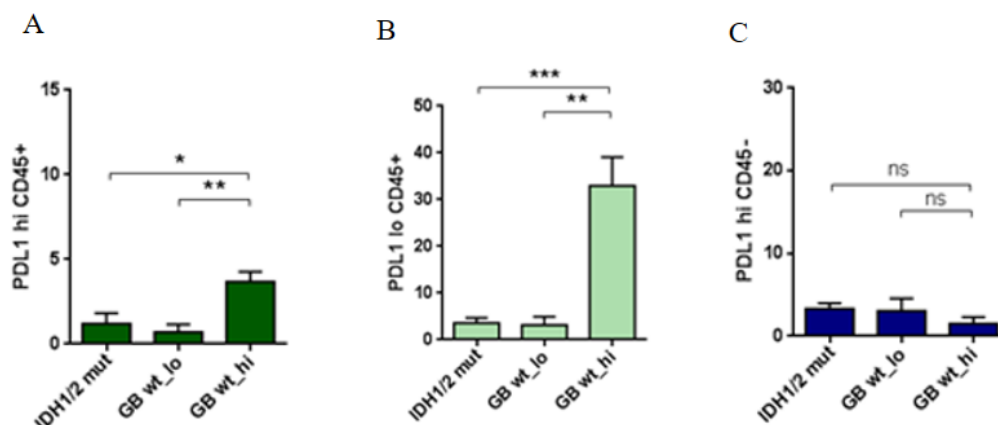
A) El histograma muestra el control de isotipo en línea gris (negativo) y niveles lo y hi de expresión de PD-L1 en la suspensión total del tumor. **B)** Los diagramas muestran el porcentaje de PD-L1 lo y PD-L1 hi en células tumorales (CD45-) y leucocitos (CD45 +) en suspensiones tumorales totales para cada subgrupo de gliomas.



El incremento de PD-L1_hi y PD-L1_lo en CD45+ fue significativo en los GBMwt_hi respecto a GBMwt_lo y los *IDH*mut. No hubo diferencias en la cantidad de células tumorales que expresan altos niveles de PD-L1 entre los diferentes subgrupos de gliomas (Gráfico 13).

Gráfico 13. Cuantificación de PD-L1 en los distintos subgrupos.

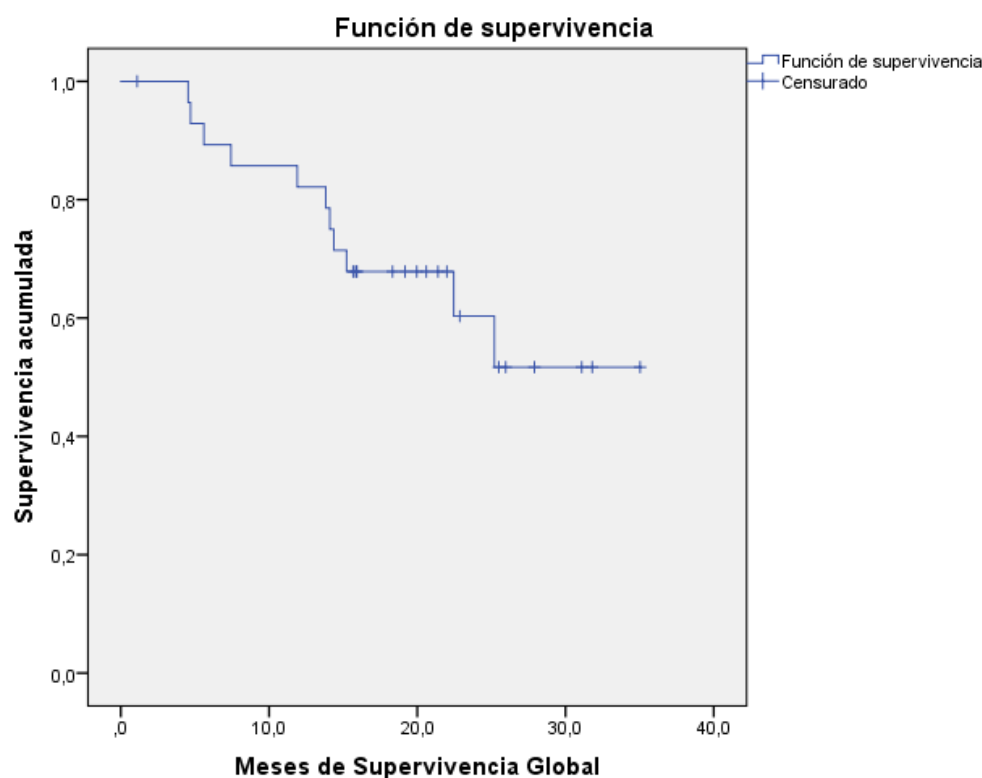
A) PD-L1_{hi} CD45⁺ (células hematopoyéticas). **B)** PD-L1_{lo} CD45⁺ (células hematopoyéticas). **C)** PD-L1_{hi} CD45⁻ (células tumorales). ns, no significativo; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.



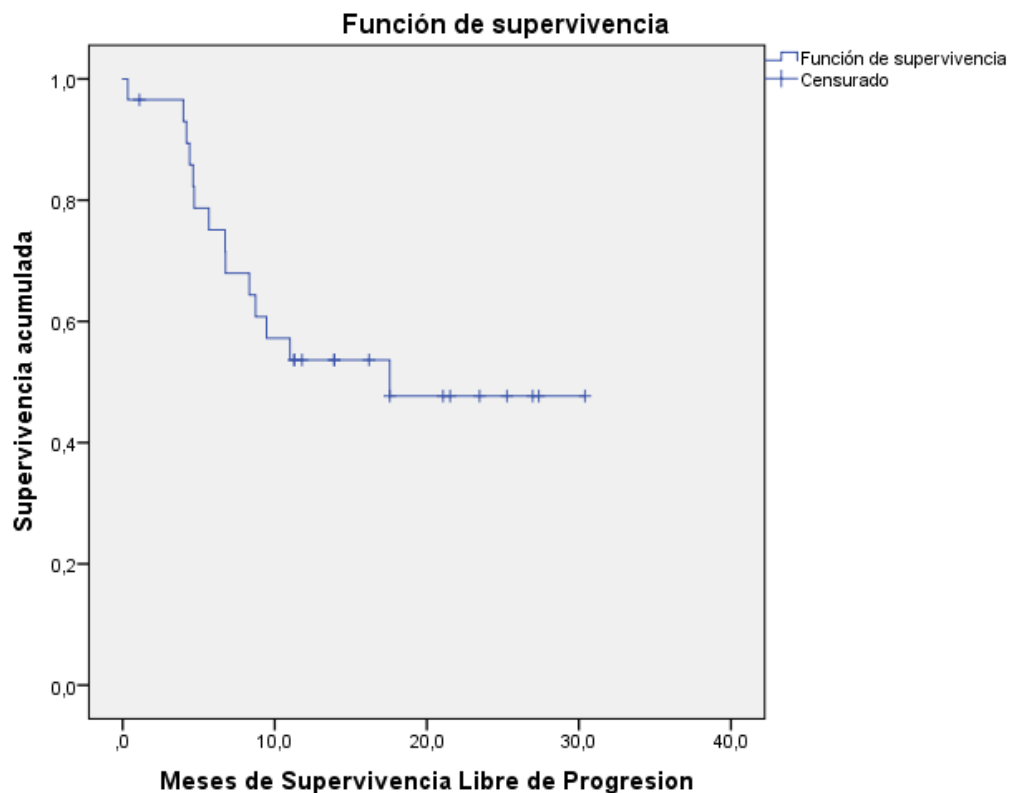
En resumen, los datos sugieren que existe un subgrupo de GBM *IDH*w/t que contienen un alto infiltrado inmune, enriquecido en células mieloides. Además, el componente hematopoyético del estroma tumoral tiene un fuerte perfil inmunosupresor, ya que está enriquecido en MDSC, células mieloides CD206 positivas y expresión de PD-L1 en las células inmunes. Por el contrario, el resto de los gliomas contienen un pequeño porcentaje de células (ya sea tumor o células hematopoyéticas) que expresan PD-L1.

4.4 Análisis de supervivencia

Los 29 pacientes fueron incluidos entre febrero de 2018 y noviembre de 2019. Se realizó seguimiento hasta enero 2021. Utilizamos el método de Kaplan-Meier y las pruebas de Log-Rank para el análisis de supervivencia con Intervalos de Confianza de 95% (IC 95%). El tiempo de seguimiento mínimo desde el diagnóstico tras la cirugía fue 1 mes y el máximo 30 meses. La mediana de seguimiento fue de 22,8 meses. El análisis de Supervivencia Global (SG) para el conjunto de todos los pacientes del estudio se muestra en el Gráfico 14, y la mediana no fue alcanzada. Durante el tiempo de seguimiento se registró el fallecimiento de 11 de los 29 pacientes incluidos. Los 18 casos censurados corresponden a los pacientes que no fallecieron durante el tiempo de seguimiento dentro de estudio.

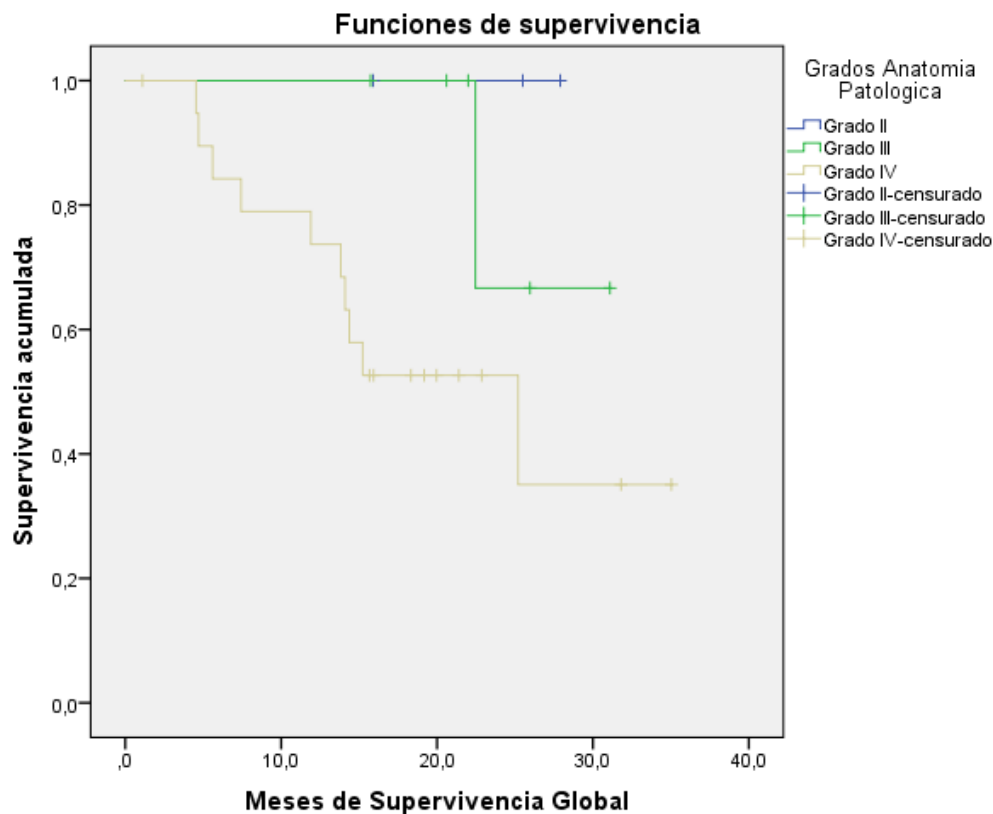
Gráfico 14. SG de todos los pacientes incluidos.

En el análisis de Supervivencia Libre de Progresión (SLP) de toda la población la mediana fue de 17,5 meses (IC 13,8-22,8). Durante el tiempo de seguimiento se registró progresión de la enfermedad tumoral en 14 de los 29 pacientes incluidos. El análisis de SLP está representado en el Gráfico 15 a partir de una curva de Kaplan-Meier que muestra la probabilidad de presentar progresión de la enfermedad en función de los meses transcurridos desde el diagnóstico. Los 15 casos censurados corresponden a los pacientes que no presentaron progresión tumoral durante el tiempo de seguimiento dentro de estudio.

Gráfico 15. SLP de todos los pacientes incluidos.

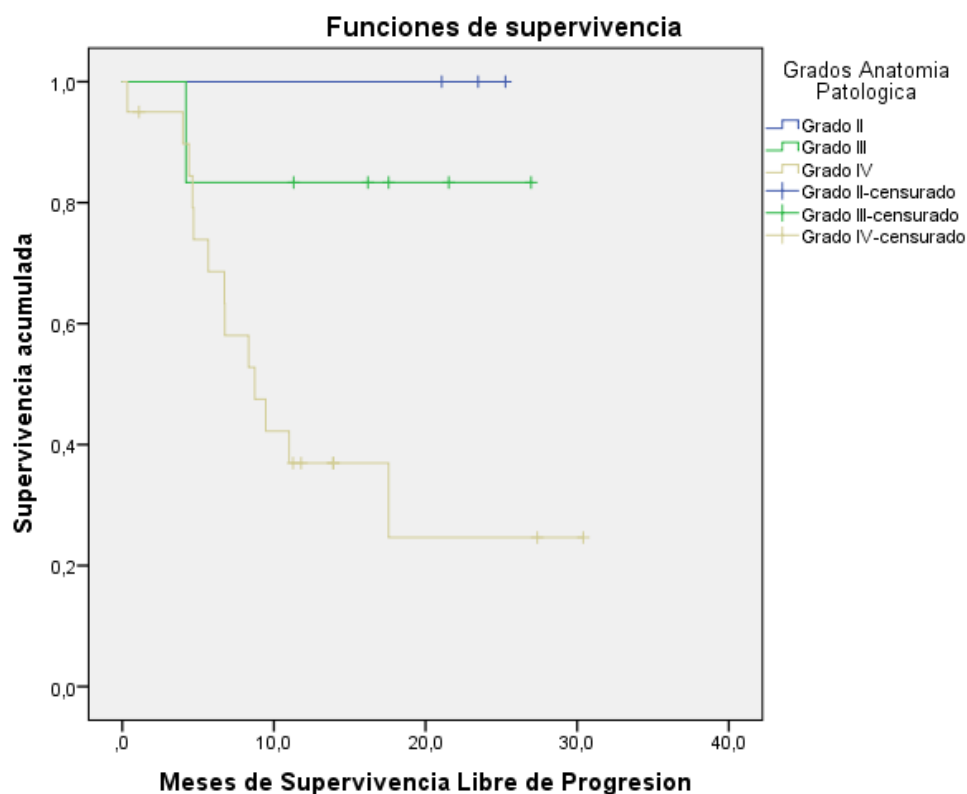
4.4.1 Análisis de supervivencia en función del grado histológico

Realizamos un análisis de SG en función del grado histológico del tumor (II, III o IV). Para la comparación entre grupos se utilizó la prueba de Log-Rank, prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para los distintos grados histológicos. Ninguno de los 3 pacientes incluidos con tumores de grado II fallecieron durante el tiempo de seguimiento. De los 6 pacientes incluidos con tumores de grado III, 1 falleció durante el seguimiento. En el grupo de los 20 pacientes con GBM (grado IV), se registraron 10 fallecimientos. Los casos censurados corresponden a los pacientes que no fallecieron durante el tiempo de seguimiento. El Gráfico 16 representa la SG según el grado histológico del tumor.

Gráfico 16. SG en función del grado histológico del tumor.

Estudiamos la SLP para los distintos grupos histológicos. Ninguno de los 3 pacientes grado II presentaron progresión de la enfermedad durante el tiempo de seguimiento. Solo 1 paciente del grupo de tumores con grado histológico III presentó progresión de la enfermedad. En el grupo de pacientes diagnosticados de grado IV, 13 de los 20 pacientes presentaron progresión durante el seguimiento. En total 14 pacientes de los 29 estudiados mostraron empeoramiento del tumor durante el tiempo de seguimiento dentro de estudio.

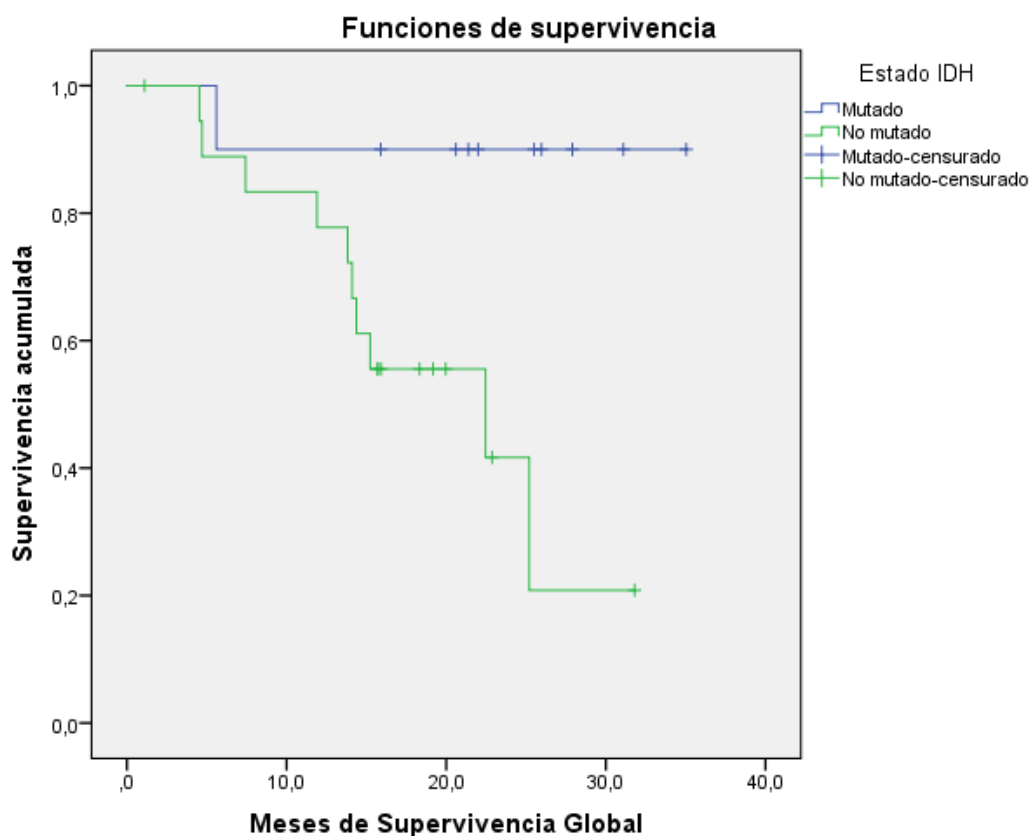
El Gráfico 17 es una curva de Kaplan-Meier que muestra la probabilidad de presentar progresión de la enfermedad en función de los meses transcurridos desde el diagnóstico según el grado histológico, $p = 0,034$.

Gráfico 17. SLP en función del grado histológico del tumor.

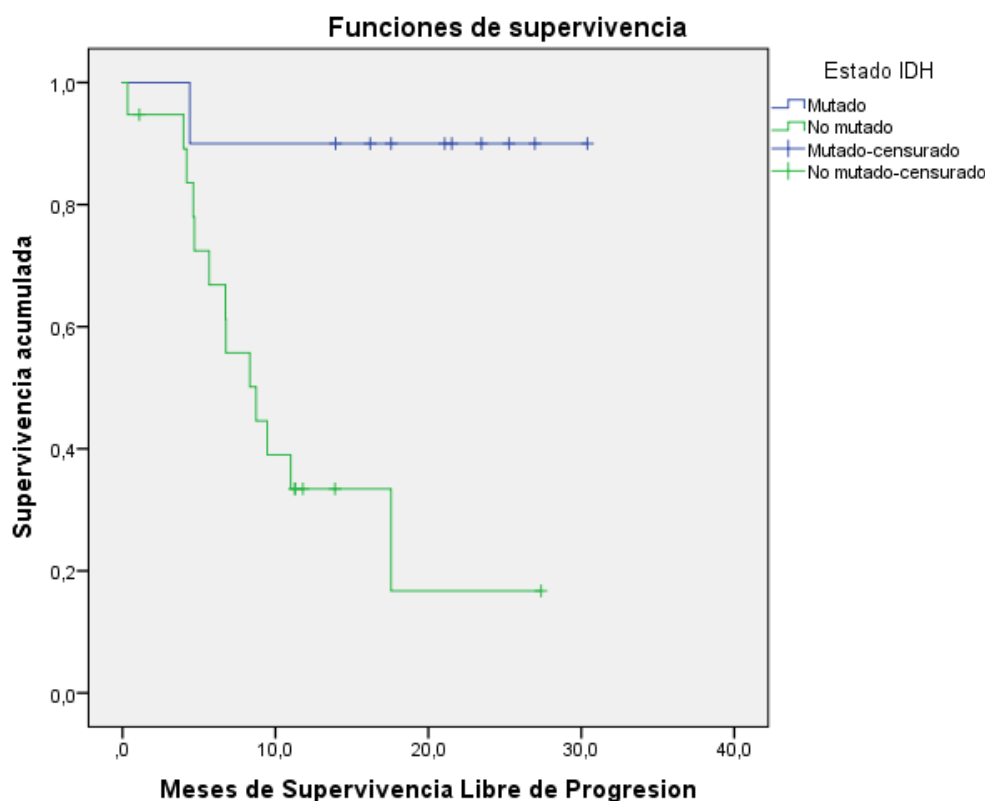
4.4.2 Análisis de supervivencia en función del estado de *IDH*

Dependiendo del estado del gen *IDH*, mutado o no mutado (w/t), los GBM se dividen en dos grupos con diferente pronóstico. Los gliomas con mutación en *IDH* presentan supervivencias más prolongadas por lo que realizamos el análisis de SG y SLP en nuestro grupo dividiendo los pacientes en función de la presencia o ausencia de mutación en *IDH* en las células tumorales. Respecto a la SG, solo 1 paciente de los 10 gliomas con mutación de *IDH* falleció durante el seguimiento. En el grupo de los 19 pacientes con gliomas *IDH* w/t se registraron 10 muertes durante el seguimiento, lo que significa que fallecieron el 52,4% de los pacientes *IDH* no mutados.

La mediana de SG no fue alcanzada en el grupo de tumores *IDH* mutados. En el grupo de pacientes *IDH* w/t la mediana de supervivencia fue de 22,4 meses (IC 7,2-37,6). El Gráfico 18 representa la supervivencia en función del tiempo en meses transcurrido desde el diagnóstico para ambos grupos de tumores, $p=0,018$. La supervivencia fue superior en los pacientes con gliomas *IDH* mutados.

Gráfico 18. SG en función del estado de *IDH*.

En cuanto a la SLP, se registró progresión de la enfermedad en 1 paciente de los 10 que formaban el grupo de *IDH* mutados. De los 19 pacientes *IDH* w/t, 12 presentaron progresión de la enfermedad durante el seguimiento lo que corresponde a un 68,4% de los pacientes *IDH* w/t. La mediana de SLP no fue alcanzada para el grupo de gliomas *IDH* mutado y en los *IDH* w/t fue de 8,7 meses (IC 4,6-12,7), $p=0,03$. La SLP según el estado de *IDH* está representada en el Gráfico 19.

Gráfico 19. SLP en función del estado de *IDH*.

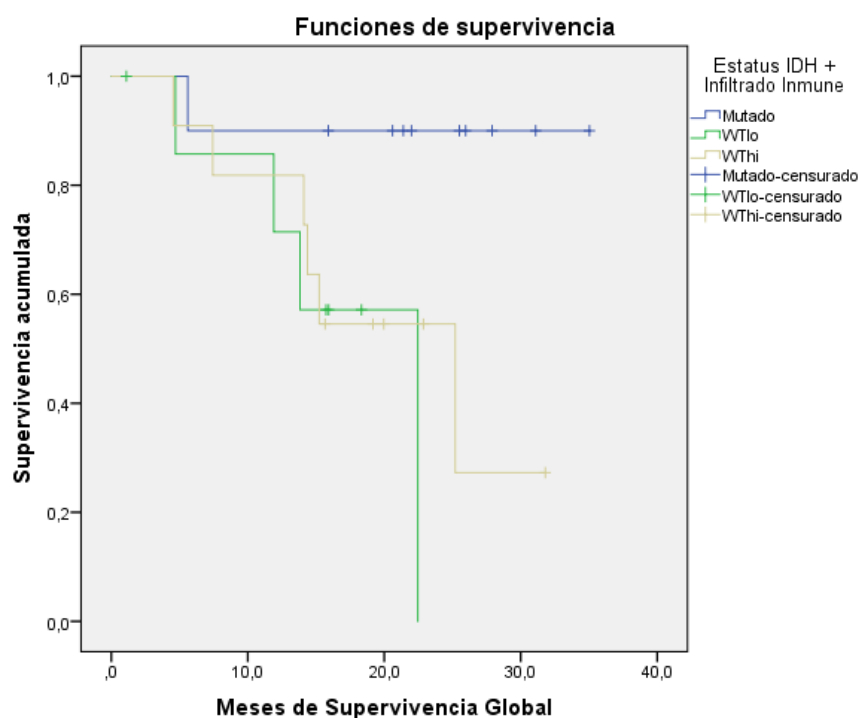
4.4.3 Análisis de supervivencia en función de *IDH* e infiltrado inmune

A partir de los resultados obtenidos del análisis de infiltrado inmune en los 29 gliomas incluidos realizamos un análisis de la SG y SLP teniendo en cuenta el estado de *IDH* y las características del infiltrado inmune tumoral, alto vs. bajo (lo vs. hi). Dentro del grupo de tumores GBM *IDH* w/t, identificamos un subgrupo con bajo contenido de células CD45+ (menos del 15% de la suspensión celular) a las que denominamos como GBMw/t_lo, con un porcentaje muy similar de células inmunes al observado en los tumores *IDH* mutados (ya sea LGG o GBM) y muy diferente del otro grupo de GBM *IDH* w/t (al que denominamos GBMwt_hi), donde las células CD45+ representan casi el 50% del contenido del tumor.

Para evaluar si las características del infiltrado inmune tumoral en los GBM *IDH* w/t tiene efecto sobre la evolución del tumor y supervivencia del paciente realizamos un análisis de SG y SLP en función del *IDH* y el infiltrado inmune. Para la comparación entre grupos se utilizó la prueba de Log-Rank, prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para los distintos grupos: *IDH* mutado, *IDH* w/t_lo e *IDH* w/t_hi. Respecto

a la SG, solo 1 de los 10 pacientes del grupo *IDH* mutado falleció durante el tiempo de seguimiento. En cuanto a los gliomas *IDH* w/t, de los 19 pacientes incluidos con estas características 8 pertenecían al grupo GBM *IDH* w/t_lo (WTlo) y 11 al grupo GBM *IDH* w/t_hi (WThi). En el grupo WTlo 4 de los 8 pacientes fallecieron durante el seguimiento. En el grupo WThi se registró el fallecimiento de 6 de los 11 pacientes, lo que corresponde al 45,5%. La mediana de supervivencia fue de 22,5 meses para el grupo WTlo y 25,2 meses (IC 13,1-37,3) para el grupo WThi. La mediana de supervivencia no fue alcanzada para el grupo *IDH* mutado. El Gráfico 20 representa a partir de curvas de Kaplan-Meier la evolución de la SG para los distintos grupos mencionados. Para la comparación entre grupos se utilizó la prueba de Log-Rank, prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia atendiendo a estatus de *IDH* e infiltrado inmune (lo vs. hi), $p = 0,054$.

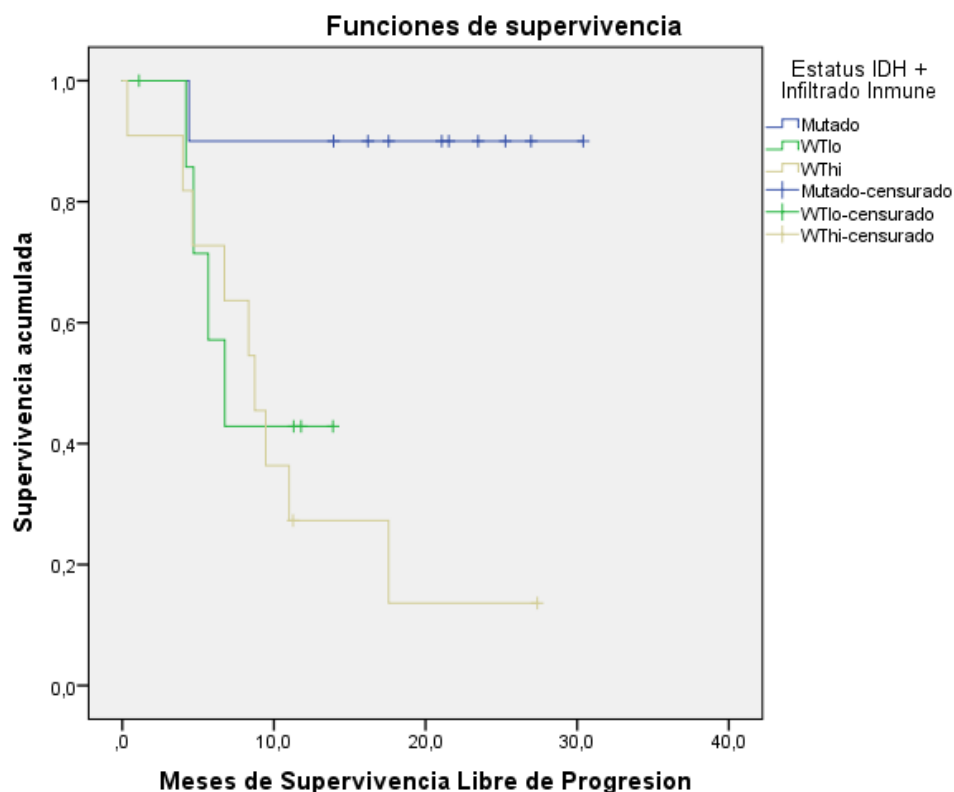
Gráfico 20. SG en función del estado de *IDH* y el infiltrado inmune tumoral (WTlo vs. WThi).



Estudiamos la SLP para estos grupos: mutado, WTlo y WThi. En el grupo de los gliomas con mutación de *IDH* solo 1 paciente, de los 10 incluidos, progresó durante el seguimiento. En el grupo WTlo se registró progresión tumoral en 4 de los 8 pacientes mientras que en el grupo WThi la progresión se confirmó por RMN en 9 de los 11 pacientes, lo que significa que el 82% de pacientes de este grupo empeoraron de su enfermedad tumoral durante el seguimiento dentro del estudio. La mediana de SLP no

fue alcanzada para el grupo de gliomas *IDH* mutado. La mediana fue de 6,8 meses (IC 3,9-9,6) en el grupo WTlo y 8,7 (IC 5,8-11,7) en el grupo WThi. El Gráfico 21 muestra la evolución de SLP en los tres grupos, $p=0,01$.

Gráfico 21. SLP en función del estado de *IDH* y el infiltrado inmune tumoral (WTlo vs. WThi).

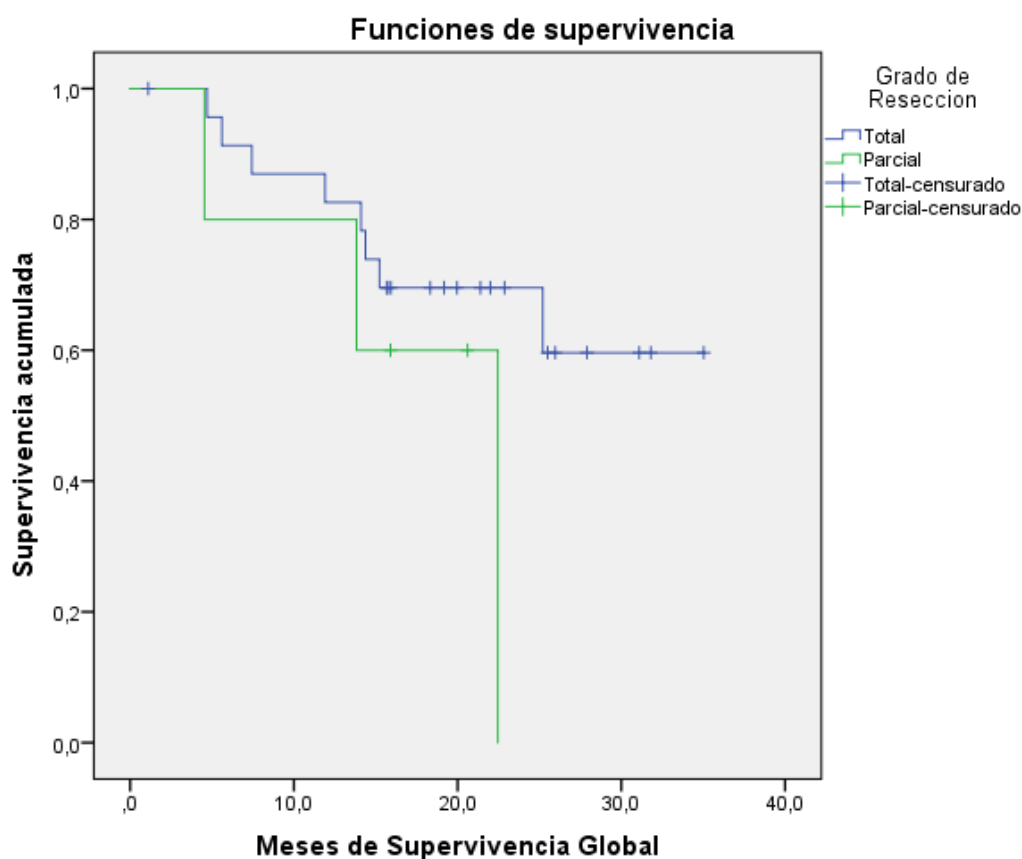


4.4.4 Análisis de supervivencia en función del grado de resección

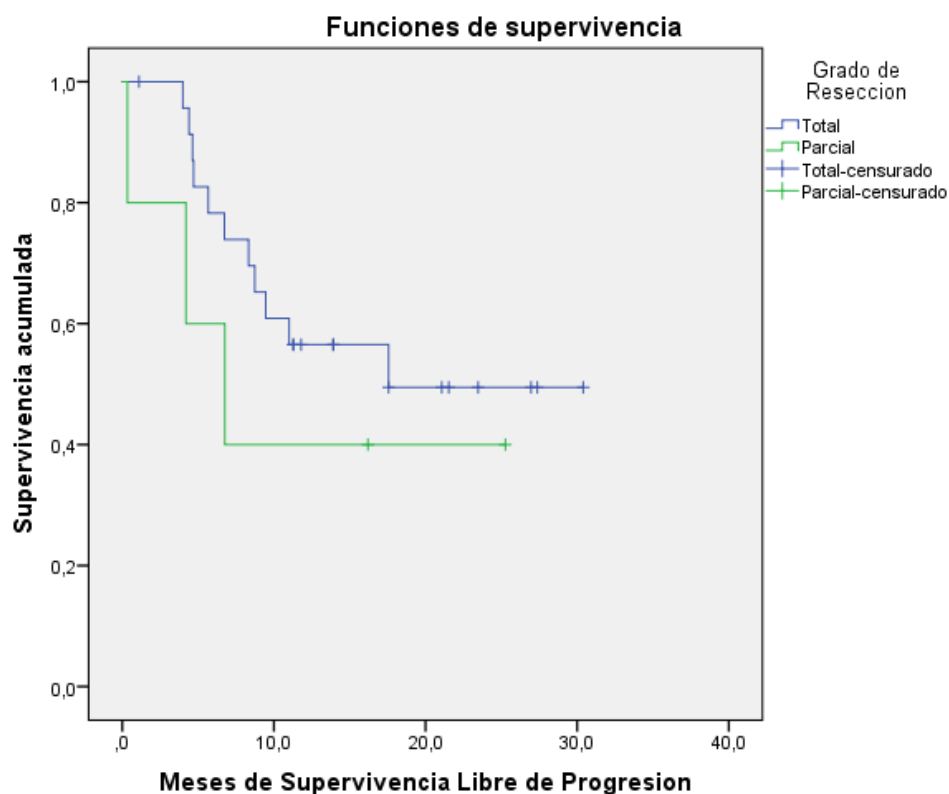
Como ya hemos comentado previamente, el tratamiento estándar inicial de los gliomas consiste en la resección máxima del tumor. La neurocirugía juega un papel clave y los avances técnicos en esta disciplina han supuesto importantes mejoras en el tratamiento de los pacientes con gliomas. Se recomienda una resección quirúrgica amplia que por otro lado preserve la función neurológica del paciente (15). Por todo esto, se realizó un análisis de supervivencia a partir de la variable grado de resección que clasifica el tipo de cirugía en total o subtotal vs. parcial (0=total o subtotal; 1=parcial) atendiendo al volumen de restos tumorales en la RMN tras cirugía. Se considera una resección total o subtotal si esta ha sido al menos del 90% del volumen tumoral calculado en la RMN inicial. De los 29 pacientes incluidos: 24 pacientes fueron operados con resección

total/subtotal y solo en 5 se llevó a cabo una resección parcial del tumor. En cuanto a la SG en función del grado de resección, 8 de los 24 pacientes en los que se realizó una resección amplia del tumor fallecieron durante el seguimiento (33,3%). En el grupo de pacientes con resección tumoral parcial, 3 de los 5 pacientes fallecieron durante el tiempo de seguimiento dentro de estudio (60%). La mediana: no fue alcanzada para los pacientes con resección total/subtotal y fue de 22,4 meses para los pacientes con resección parcial. El Gráfico 22 muestra la evolución en términos de SG para los dos grupos en función del tipo de resección quirúrgica, $p=0,192$.

Gráfico 22. SG en función del grado de resección quirúrgica.



Respecto a la SLP de los 24 pacientes con tumores resecados de forma total/subtotal, 11 progresaron durante el seguimiento (45,8%). De los 5 pacientes con resección parcial del tumor 3 mostraron progresión de la enfermedad (60%). La mediana alcanzada fue de 17,5 meses para los resecados de forma completa y 6,7 meses para los tumores con resección parcial (IC 1,2-12,2). El Gráfico 23 muestra la evolución de la SLP para los distintos niveles de resección tumoral, $p=0,363$.

Gráfico 23. SLP en función del grado de resección quirúrgica.

4.4.5 Análisis de supervivencia en función del estado funcional inicial

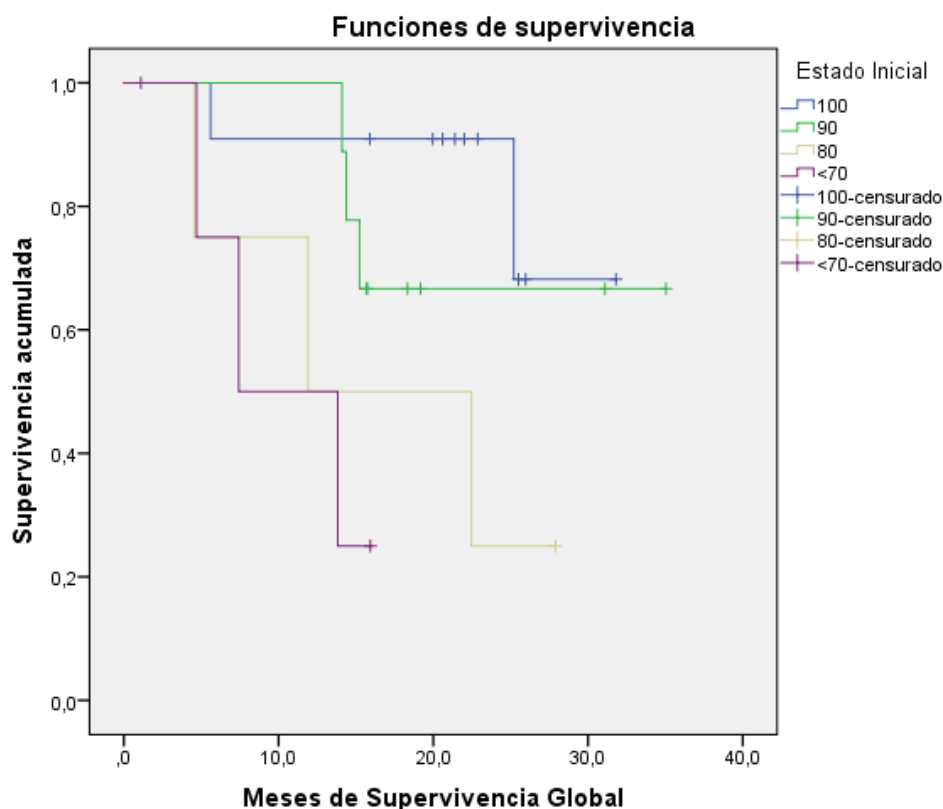
Definimos el estado funcional de un paciente como la capacidad de llevar una vida ambulatoria independiente para las actividades básicas de la vida diaria. Éste es reconocido como un importante factor pronóstico en los pacientes oncológicos, es decir, a mejor estado funcional, mejor pronóstico. Existen múltiples escalas para definirlo una de las cuales es *Karnofsky Performance Status Scale* (KPS). En la Tabla 7 se detalla la clasificación KPS.

Tabla 7. Karnofsky Performance Status Scale (KPS).

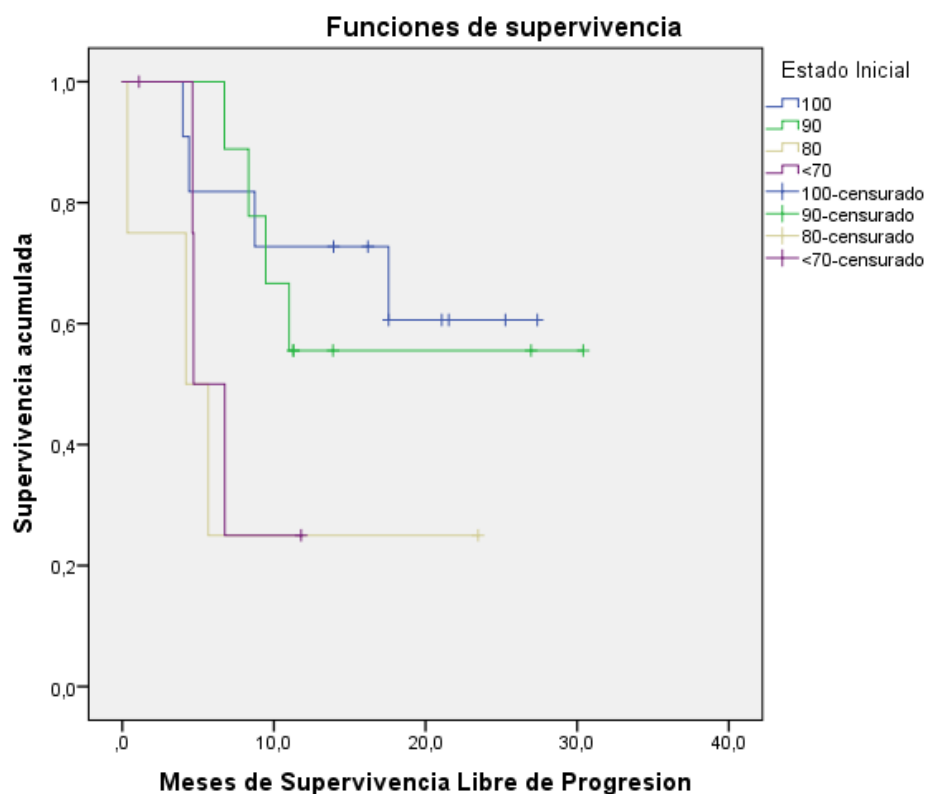
Definición	%	Criterio
Capaz de realizar actividad normal y de trabajar. No requiere cuidados especiales	100	Normal, no hay molestias. No hay evidencia de enfermedad
	90	Capaz de realizar actividad normal. Signos y síntomas menores de enfermedad
	80	Actividad normal con esfuerzo. Algunos signos y síntomas de enfermedad
Incapaz de trabajar. Capaz de vivir en casa y de satisfacer la mayoría de las necesidades personales. Requiere una cantidad variable de asistencia	70	Cuida de sí mismo. Incapaz de realizar actividad normal o de realizar trabajo activo
	60	Requiere de asistencia ocasional, pero es capaz de satisfacer la mayoría de sus necesidades
	50	Requiere asistencia considerable y cuidados médicos frecuentes
Incapaz de cuidarse por sí mismo. Requiere cuidados institucionales u hospitalarios. La enfermedad puede estar progresando rápido	40	Discapacitado. Requiere cuidados especiales y asistencia
	30	Gravemente discapacitado. Hospitalización está indicada aunque muerte no se ve inminente
	20	Muy enfermo, hospitalización es necesaria. Tratamientos de soporte activo son necesarios
	10	Moribundo, proceso fatal progresando rápidamente
	0	Fallecido

Fuente: Pérez- Cruz E y Acevedo F. Escalas de estado funcional (o performance status) en cáncer (93).

Realizamos un análisis en términos de supervivencia a partir de la variable recogida KPS al diagnóstico que define el estado general del paciente según la escala tras la cirugía de resección (0=100; 1=90; 2=80; 3= 70 o menor). Tras la intervención de los 29 pacientes incluidos: 11 presentaban KPS de 100, 9 presentaban KPS de 90, 4 presentaban KPS de 80 y 5 KPS de 70 o menor. En cuanto a la SG de los 11 pacientes con KPS de 100 2 fallecieron durante el seguimiento. De los 9 con KPS 90 se registró el fallecimiento de 3 pacientes. En el grupo de los 4 pacientes con KPS 80 se registraron 3 muertes y de los 5 pacientes con KPS <70 3 pacientes fallecieron durante el seguimiento dentro de estudio. La mediana de SG no se alcanzó en el grupo de pacientes con KPS 100 y 90. La mediana de SG para KPS 80 y <70 fue 11,9 (IC 0-29,4) y 7,4 (IC 0-16,3) meses respectivamente. El Gráfico 24 muestra la evolución de la SG en función de los grupos a partir del KPS tras la cirugía, $p=0,02$.

Gráfico 24. SG en función del estado funcional tras la cirugía según KPS.

En el análisis de SLP en función de la puntuación KPS inicial: mostraron progresión de la enfermedad 4 de los 11 pacientes incluidos con KPS 100. En los grupos de KPS 90, 80 y <70 la progresión de la enfermedad se objetivó en 4, 3 y 3 pacientes respectivamente durante el tiempo de seguimiento dentro de estudio. La mediana para estos dos grupos KPS 80 y <70 fue 4,2 (IC 0-9,4) y 4,7 (IC 2,6-6,7) meses respectivamente. No se alcanzó la mediana de SLP para los grupos KPS 100 y KPS 90. El Gráfico 25 muestra la evolución de la SLP para los 4 grupos en función de KPS, $p=0,116$.

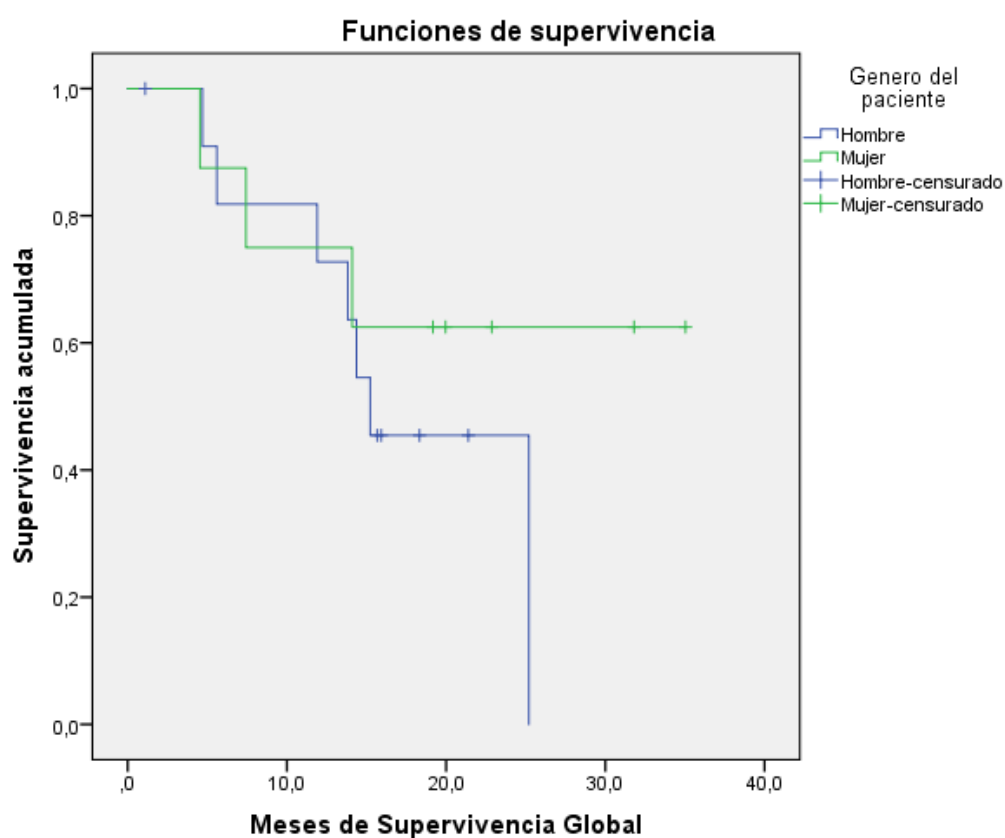
Gráfico 25. SLP en función del estado funcional tras la cirugía según KPS.

4.4.6 Análisis de supervivencia en GBM en función del género

Los datos epidemiológicos hasta la fecha muestran que el GBM tiene una mayor incidencia en hombres que en mujeres (8). Existen estudios que demuestran que el sexo influye en la supervivencia de los pacientes con GBM (94). Comparado con los pacientes masculinos, las pacientes femeninas con GBM tienen mayores tasas de supervivencia cáncer específica después de la cirugía (94). No obstante, se necesitan más estudios al respecto hasta que las diferencias entre hombres y mujeres con esta patología puedan ser descritas con exactitud y supongan cambios en el manejo terapéutico. En otros tumores como el cáncer gástrico (95) o colorrectal (96) se han descrito diferencias relacionadas con el género del paciente apoyando el papel protector de los estrógenos en estas neoplasias, sin embargo el papel protector de esta hormona no ha sido investigado a fondo en el GBM y disponemos de poca información en lo referente a la diferencia en términos de supervivencia en hombres y mujeres afectados de este tumor. Por todo lo anterior y teniendo en cuenta que el género era una de las variables recogidas en la base de datos del estudio hemos llevado a cabo un análisis de supervivencia para los pacientes con

GBM en función del mismo (0= hombre; 1= mujer). De los 20 pacientes con GBM incluidos en nuestro estudio, 12 eran hombres y 8 mujeres. En el análisis de SG: 7 de los 12 hombres (58,3%) y 3 de las 8 mujeres (37,5%) con GBM fallecieron durante el seguimiento. La mediana de tiempo de supervivencia fue de 15,2 meses en hombres (IC 9,9-20,4). En el grupo de mujeres la mediana no se alcanzó durante el seguimiento realizado dentro del estudio. El Gráfico 26 muestra el análisis de SG en función del género del paciente. Para la comparación entre grupos se utilizó la prueba de Log-Rank, prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para hombres vs. mujeres, $p=0,339$.

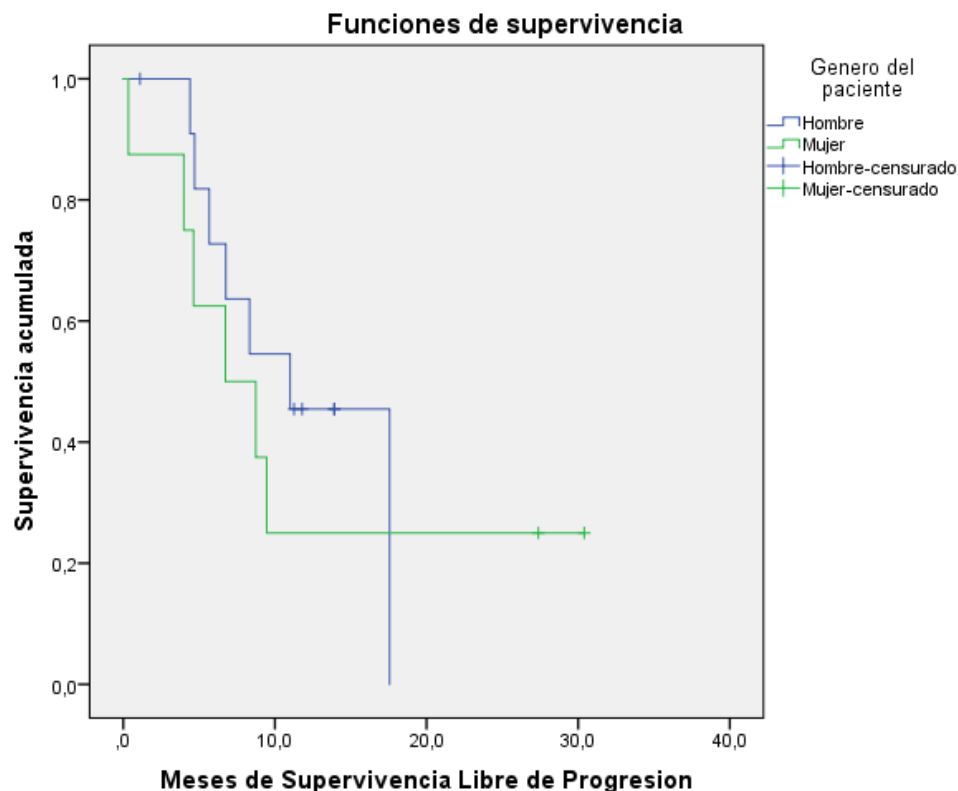
Gráfico 26. SG en función del género del paciente.



Realizamos el análisis de la SLP en función del género. De los 12 hombres con GBM 7 mostraron progresión de la enfermedad (58,3%). En el grupo de las mujeres se objetivó progresión de la enfermedad en 6 de las 8 pacientes incluidas con GBM (75%). La mediana de tiempo hasta la progresión de enfermedad fue superior en hombres: 11 meses (IC 6- 15,9) vs. 6,7 meses en el grupo de mujeres (IC 1-12,4). El Gráfico 27 muestra el análisis de SLP en función del género del paciente. Para la comparación entre grupos

se utilizó la prueba de Log-Rank, prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para hombres vs. mujeres, $p=0,537$.

Gráfico 27. SLP en función del género del paciente.



4.5 Descripción de poblaciones inmunes en sangre periférica al diagnóstico

Los pacientes oncológicos presentan de forma frecuente una disminución de la serie blanca en sangre periférica, en muchos casos, debido a los tratamientos citotóxicos administrados, pero su relación con la evolución tumoral y la respuesta a los tratamientos no está clara. Por otro lado, la disfunción de las células T inducida por el tumor facilita el escape inmunológico de las células tumorales y compromete la respuesta inmune del organismo frente al mismo. Linfopenia y neutropenia son eventos frecuentes, bien definidos en estos pacientes y que suponen una complicación, en ocasiones grave, durante el tratamiento. Además, sabemos que el GBM es inmunogénico pero está asociado con una marcada inmunosupresión local. La existencia de linfopenia al diagnóstico en pacientes con GBM fue descrita por primera vez en 1977 por Mahaley et al. (97). Desde

entonces distintos estudios han considerado la linfopenia como una característica remarcable asociada a este tumor. No obstante, hasta la fecha, el recuento de glóbulos blancos no se ha llegado a considerar un marcador en sangre para el glioma debido a resultados contradictorios de diferentes estudios al respecto (98). Aunque la amplia disponibilidad y el bajo coste de las analíticas de rutina hacen a las poblaciones celulares en sangre atractivas como marcadores, por el momento no se ha podido confirmar su relevancia clínica (99) y la realidad a fecha actual es, que en gliomas, carecemos de marcadores en sangre como sí tenemos disponibles en otros tumores (mama, ovario, próstata o colon entre ellos).

En pacientes con glioma se han descrito aumentos en los recuentos de leucocitos en sangre periférica en comparación con los controles (100,101,102). Pero a día de hoy no está claro si los valores de la serie blanca se correlacionan con los grados de tumor más altos (101,103) y peores (104,105,106) ya que múltiples estudios han informado de ambos: resultados estadísticamente significativos y resultados no significativos. En cuanto a los linfocitos en sangre periférica distintos estudios han descrito en sus resultados disminuciones significativas de linfocitos totales en pacientes con glioma (101,107,108), pero en muchos trabajos se apunta que esta disminución podría estar relacionada en parte con el uso de dexametasona como tratamiento de soporte. Hasta la fecha el recuento de linfocitos en sangre no se ha podido correlacionar extensamente con el grado tumoral, la supervivencia o el estado de *IDH* y son necesarios más estudios para determinar la relevancia de los linfocitos como biomarcador en sangre. Los neutrófilos también han sido estudiados. La mayoría de los análisis hasta el momento muestran aumento del recuento de neutrófilos en los pacientes con glioma respecto a los controles (100,101,103) sobre todo en los gliomas de alto grado, pero no está claro si los neutrófilos están relacionados con el estado de mutación *IDH* u otras características de los gliomas (109,110) y por el momento no existe evidencia suficiente como para considerar la cifra de neutrófilos como un valor pronóstico en pacientes con gliomas (99). Ocurre algo similar con los monocitos, y es que hasta la fecha, pese a los múltiples estudios realizados alrededor de esta cuestión, no está claro si su recuento en sangre varía en pacientes con glioma en comparación con los controles sanos o si están relacionados con el grado del tumor (101,103).

Por todo lo anterior el estudio de poblaciones celulares en sangre periférica tiene todavía interés creciente en los pacientes con gliomas. En el presente estudio se buscó una correlación entre las alteraciones de estas poblaciones en sangre periférica y las características del glioma y su evolución clínica. Para ello, se evaluó el grado de inmunosupresión que presentan al diagnóstico del tumor (previo a la cirugía de resección) los pacientes incluidos en nuestro estudio. Ante la evidencia de que la respuesta inmune es distinta entre los gliomas *IDH* mutados y w/t, se buscó si las diferencias detectadas en el infiltrado tumoral tienen también representación en las poblaciones inmunes circulantes. Los objetivos de este apartado son:

- Cuantificar la celularidad inmune en sangre periférica al diagnóstico de glioma, es decir, antes de la cirugía de resección y describirla en los 29 pacientes incluidos relacionándola con el grado histológico tumoral.
- Describir la linfopenia y sus grados al diagnóstico de GBM en función del estado de *IDH* mutado vs. w/t y relacionarlo con el infiltrado inmune tumoral alto vs. bajo (hi vs. lo).
- Describir las diferencias en la celularidad inmune en sangre en función del género.

Para ello trabajamos con las variables: leucocitos, neutrófilos, linfocitos y monocitos precirugía que recogen el recuento en valor absoluto de las distintas células inmunes en sangre previo a la resección de tumor. Señalar que ninguno de los pacientes estaba en tratamiento con corticoides en el momento de la obtención de la muestra al diagnóstico, antes de la cirugía. Esto es importante pues las dosis altas o mantenidas de corticoides, que habitualmente se utilizan como fármacos antiinflamatorios y antiedema en esta patología, pueden alterar las poblaciones inmunes en sangre periférica generando linfopenia. Los grados de linfopenia y neutropenia fueron descritos de acuerdo con los criterios del *National Cancer Institute* (NCI) de los Estados Unidos a partir del NCI *Common Terminology Criteria for Adverse Events* versión 5.0 (CTCAE) (Tabla 8).

Tabla 8. Grados de linfopenia y neutropenia de acuerdo con CTCAE versión 5.0.

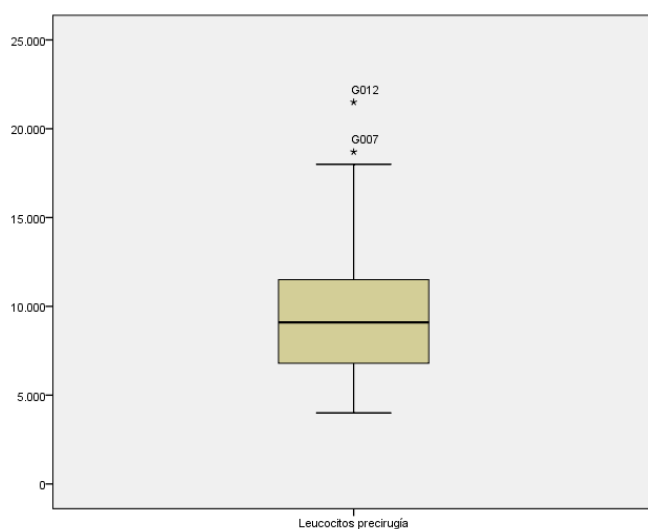
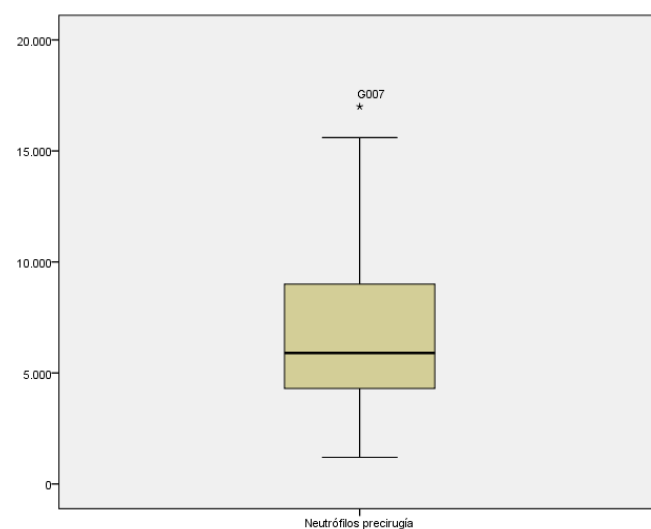
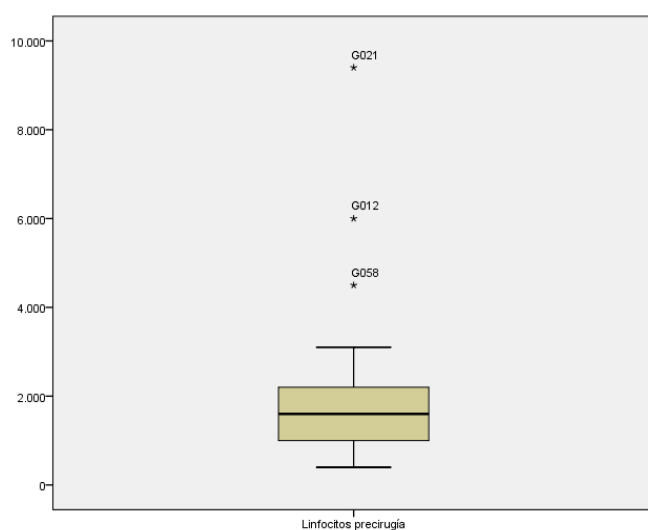
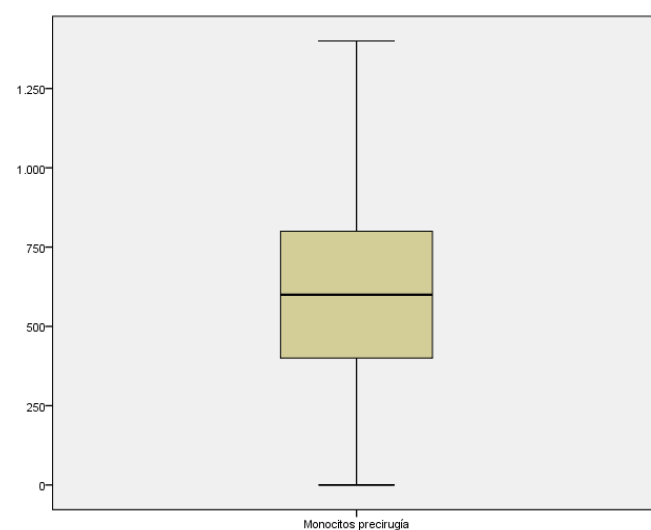
Evento adverso	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	Grado 5
Linfopenia	Desde 800/mm ³ (0.8 x 10 ⁹ /l) hasta el LIN (1200/mm ³)	Desde 500/mm ³ (0.5 x 10 ⁹ /l) hasta 800/mm ³ (0.8 x 10 ⁹ /l)	Desde 200/mm ³ (0.2 x 10 ⁹ /l) hasta 500/mm ³ (0.5 x 10 ⁹ /l)	Inferior a 200/mm ³ (0.2 x 10 ⁹ /l)	Exitus
Neutropenia	Desde 1500/mm ³ (1.5 x 10 ⁹ /l) hasta el LIN (1800/mm ³)	Desde 1000/mm ³ (1.0 x 10 ⁹ /l) hasta 1500/mm ³ (1.5 x 10 ⁹ /l)	Desde 500/mm ³ (0.5 x 10 ⁹ /l) hasta 1000/mm ³ (1.0 x 10 ⁹ /l)	Inferior a 500/mm ³ (0.5 x 10 ⁹ /l)	Exitus

*LIN: Límite inferior normal.

4.5.1 Celularidad inmune en sangre periférica al diagnóstico del glioma y relación con el grado histológico tumoral

Atendiendo a los grados de neutropenia, de acuerdo con CTCAE versión 5.0, previo a la resección tumoral solo 2 pacientes presentaron neutropenia grado 1 y grado 2 respectivamente. El paciente con neutropenia grado 1 fue diagnosticado de GBM *IDH* mutado y el paciente con neutropenia grado 2 de GBM *IDH* w/t. Los 27 pacientes restantes presentaban cifras de neutrófilos normales en sangre. En cuanto a la linfopenia, esta fue más común presentándola hasta un total de 9 pacientes. De éstos: 3 presentaron linfopenia grado 1, 4 pacientes grado 2 y 2 pacientes grado 3. Los 3 pacientes con linfopenia grado 1 fueron diagnosticados de: oligodendroglioma grado II *IDH* mutado, GBM *IDH* mutado y GBM *IDH* w/t respectivamente. Entre los 4 pacientes con linfopenia grado 2 los diagnósticos histológico moleculares fueron: oligodendroglioma grado II *IDH* mutado, astrocitoma grado III *IDH* mutado, GBM *IDH* mutado y GBM *IDH* w/t. Los 2 pacientes con linfopenia grado 3 corresponden a un astrocitoma grado III *IDH* mutado y un GBM *IDH* w/t. Los 20 pacientes restantes presentaban cifras de linfocitos normales en la analítica previa a cirugía de resección de tumor.

En el Gráfico 28, Gráfico 29, Gráfico 30 y Gráfico 31 quedan representadas las distribuciones de los recuentos en valores absolutos para las distintas células inmunes en sangre de los 29 pacientes operados de glioma.

Gráfico 28. Leucocitos precirugía.**Gráfico 29.** Neutrófilos precirugía.**Gráfico 30.** Linfocitos precirugía.**Gráfico 31.** Monocitos precirugía.

Los números al lado de los asteriscos corresponden al código de identificación del paciente dentro de estudio con el valor celular representado. Los cuatro pacientes: G007, G012, G021 y G058 habían sido diagnosticados de GBM *IDH* w/t. En los casos G012 y G058 con bajo infiltrado inmune en tumor (lo) al contrario de lo observado en el análisis tumoral de G007 y G021 en el cual el infiltrado tumoral era alto (hi).

Realizamos el análisis del recuento de células inmunes en sangre al diagnóstico atendiendo al grado histológico del tumor II, III o IV. No se incluyó ningún paciente diagnosticado de glioma grado I (astrocitoma pilocítico). El Gráfico 32, Gráfico 33,

Gráfico 34 y Gráfico 35 representan las distribuciones para cada tipo celular según el grado histológico del glioma.

Gráfico 32. Leucocitos en función de grado.

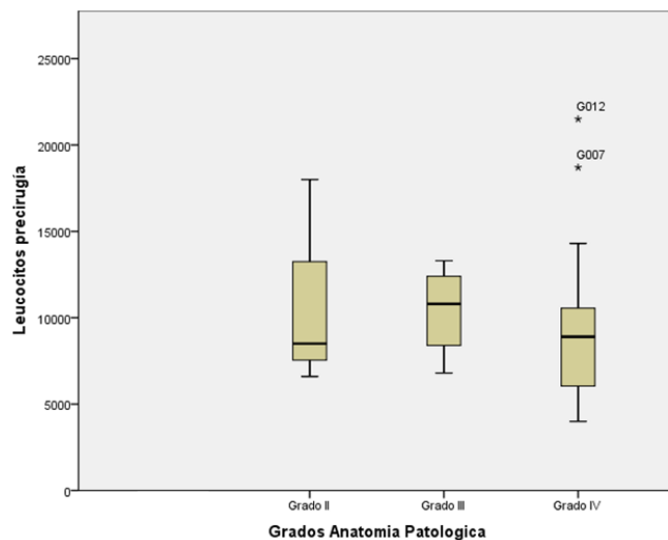


Gráfico 33. Neutrófilos en función de grado.

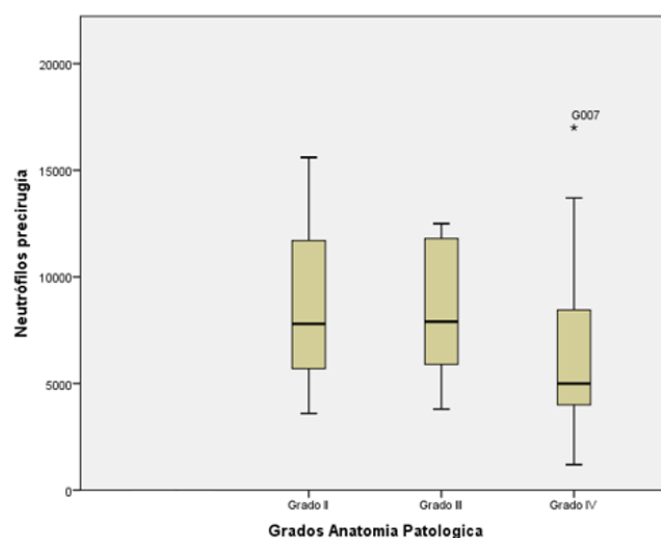


Gráfico 34. Linfocitos en función del grado.

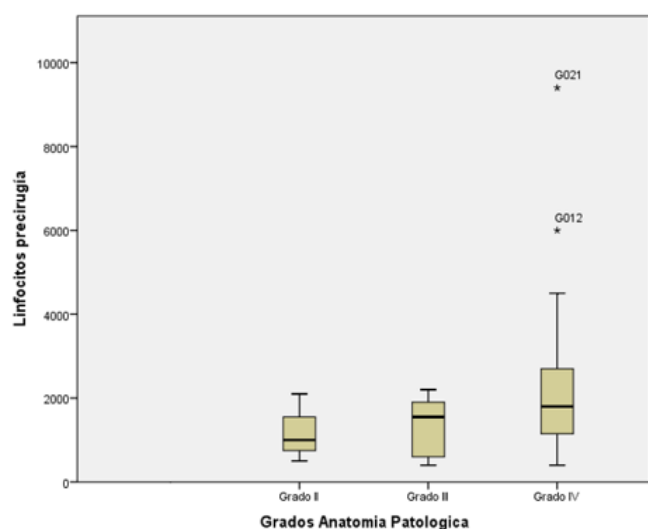
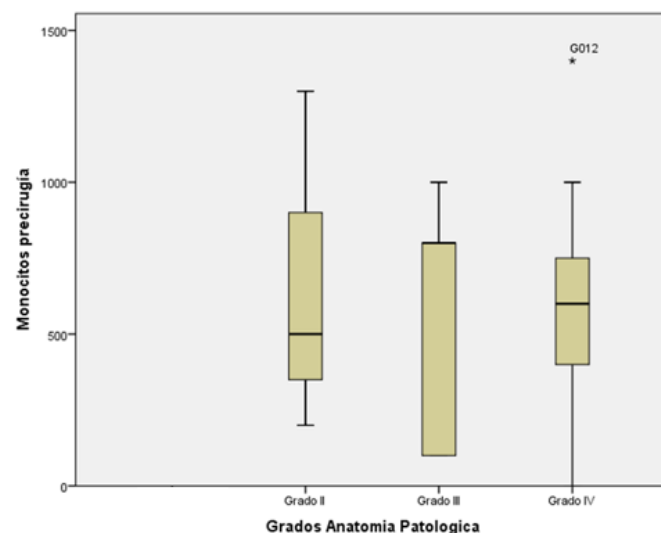


Gráfico 35. Monocitos en función del grado.



El valor de p mostró falta de significación en las diferencias en función del grado histológico para leucocitos ($p=0,296$), linfocitos ($p=0,723$) y neutrófilos ($p=0,330$). Las diferencias en monocitos según el grado de tumor si resultaron estadísticamente significativas con $p=0,013$. De forma global, los recuentos de leucocitos, linfocitos y monocitos fueron superiores en los pacientes con tumores grado III y IV respecto a los pacientes diagnosticados de gliomas grado II. Ocurre lo contrario en el recuento de neutrófilos que se ve disminuido en los pacientes con tumores grado IV respecto a los

pacientes con tumores de menor grado histológico. El paciente G007 con diagnóstico de GBM *IDH* w/t presentó un recuento muy superior a la media de neutrófilos para el grupo de GBM (grado IV). No siendo estas diferencias estadísticamente significativas, haría falta ampliar la cohorte de estudio para confirmar la variabilidad observada entre grupos estudiados.

4.5.2 Descripción de los grados de linfopenia en los GBM: relación con el estado de *IDH* y con el infiltrado inmune tumoral alto vs. bajo (hi vs. lo)

A partir de los resultados analíticos (precirugía) de los 29 pacientes incluidos calculamos el valor de la media, la mediana y el rango intercuartílico para el recuento de los distintos tipos celulares en función del infiltrado tumoral lo vs. hi. Los gliomas *IDH* mutados se han incluido en el grupo de infiltrado *low* (lo). Los resultados se detallan en la Tabla 9, donde se observa una diferencia significativa en los monocitos entre los grupos lo y hi.

Tabla 9. Valores de media, la mediana y el rango intercuartílico para los distintos tipos celulares en función del infiltrado inmune tumoral (lo vs. hi).

	Infiltrado	N	Media	Mediana	Rango intercuartílico	valor p
Leucocitos	lo	18	10138/mm3	9300/mm3	5875/mm3	0,573
	hi	11	9672/mm3	9100/mm3	4200/mm3	
Neutrófilos	lo	18	6966/mm3	5400/mm3	6525/mm3	0,748
	hi	11	7263/mm3	6600/mm3	4700/mm3	
Linfocitos	lo	18	1822/mm3	1550/mm3	1675/mm3	0,542
	hi	11	2390/mm3	1900/mm3	1500/mm3	
Monocitos	lo	18	600/mm3	600/mm3	675/mm3	0,015
	hi	11	636/mm3	600/mm3	300/mm3	

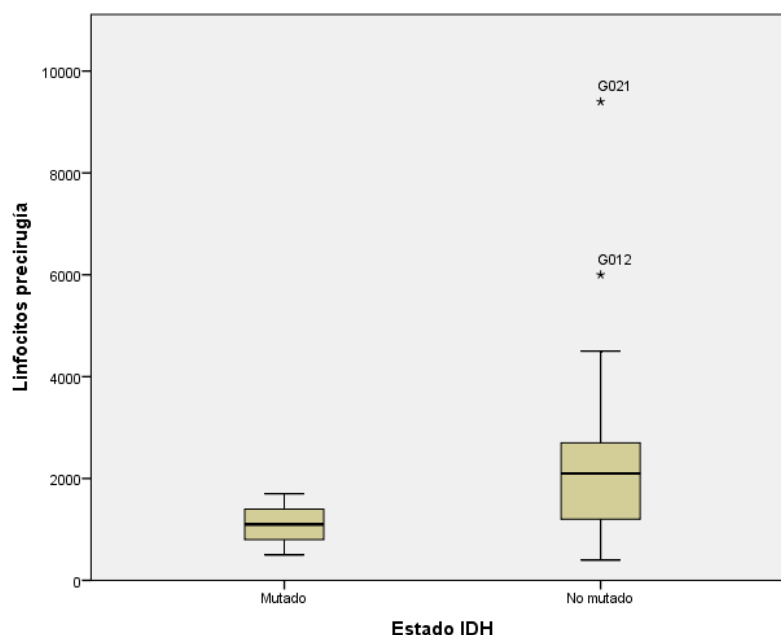
*lo: low infiltrate; hi: high infiltrate.

De los 20 pacientes incluidos con GBM (grado IV), 3 presentaban la mutación de *IDH* y los otros 17 casos eran *IDH* w/t. Al analizar los grados de linfopenia al diagnóstico en el grupo de GBM *IDH* mutado: 1 paciente presentó linfopenia grado 1, otro linfopenia grado 2 y otra una cifra normal de linfocitos en sangre. De los 17 casos con GBM *IDH* w/t: 1 presentó linfopenia grado 1, otro grado 2 y otro grado 3. Los 14

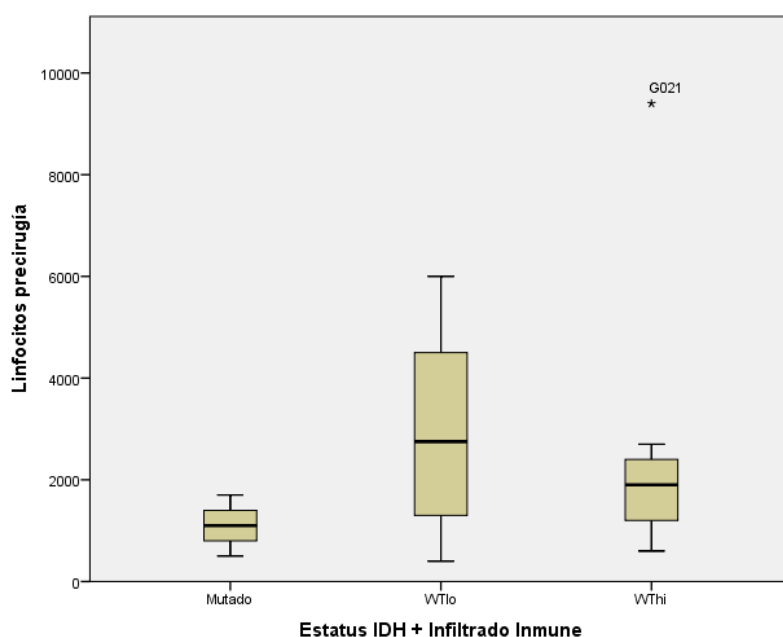
pacientes restantes del grupo con GBM *IDH* w/t presentaban cifras normales de linfocitos en sangre al diagnóstico del tumor.

Realizamos un análisis del recuento de linfocitos en sangre al diagnóstico de GBM atendiendo al estado de *IDH*. El Gráfico 36 representa la distribución de recuento los linfocitos en valor absoluto para los dos grupos de GBM *IDH* mutado e *IDH* w/t. La mediana de linfocitos precirugía de los 29 pacientes del estudio fue 1600/mm³. La mediana de linfocitos de los 3 pacientes con GBM *IDH* mutado es inferior a 1600/mm³. En el grupo de GBM *IDH* w/t formado por 17 pacientes la mediana de linfocitos es superior a 2000/mm³. Las diferencias entre las cifras de linfocitos según el estado de *IDH* no fueron estadísticamente significativas $p=0,220$. En el grupo de GBM *IDH* w/t los pacientes G012 y G021 mostraron recuentos muy superiores a la mediana del grupo siendo los valores absolutos 6000/mm³ y 9400/mm³ respectivamente.

Gráfico 36. Linfocitos precirugía en GBM *IDH* mutado y GBM *IDH* w/t.



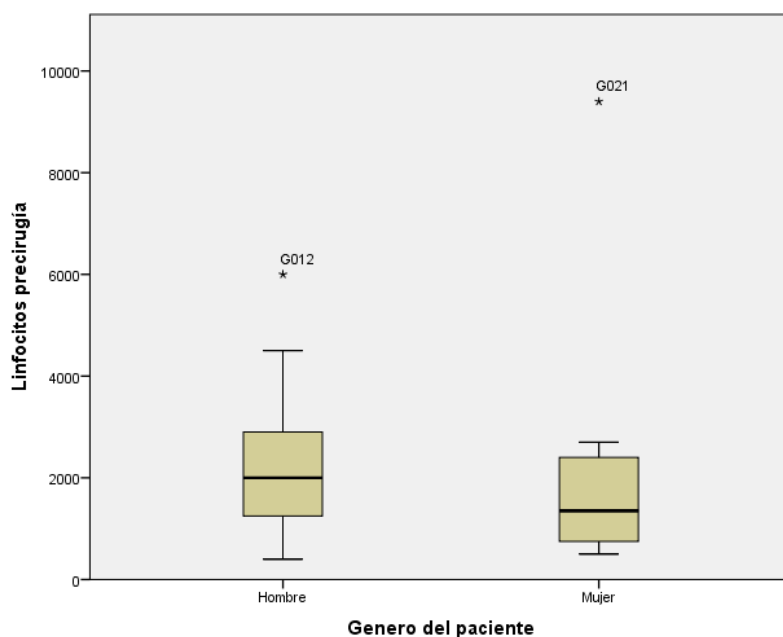
Por otro lado, realizamos el análisis del recuento de linfocitos en relación no solo con el estado de *IDH* si no también con el infiltrado inmune tumoral alto vs. bajo (hi vs. lo) en los GBM *IDH* w/t. Los resultados del Gráfico 37 muestran un aumento en el recuento de linfocitos precirugía en sangre para el grupo GBM WTlo con respecto a GBM *IDH* mutado y GBM WThi.

Gráfico 37. Linfocitos precirugía en GBM *IDH* mutado, GBM WTlo y GBM WThi.

Globalmente, los valores de linfocitos en sangre más bajos se encontraron en pacientes del grupo GBM *IDH* mutados. Las cifras de linfocitos previas a la resección tumoral fueron superiores en el grupo *IDH* WTlo en comparación con las cifras en los pacientes con tumores *IDH* WThi o *IDH* mutados no siendo las diferencias entre estos 3 grupos estadísticamente significativas ($p=0,157$) por lo que habría que ampliar la cohorte de estudio para confirmar los resultados.

4.5.3 Descripción de recuento de linfocitos en GBM en función del género

Sabemos que en la actualidad se han desarrollado trabajos que estudian las poblaciones inmunes, tanto en tumor como en sangre, en función del sexo. Resultados preliminares de estudios apuntan a la existencia de un dimorfismo sexual en cuanto a la celularidad inmune en pacientes con GBM. Se llevó a cabo el análisis de los recuentos de linfocitos en sangre en los 20 pacientes con diagnóstico GBM (tanto *IDH* mutado como w/t) en función del género. De los 20 pacientes con GBM incluidos: 7 eran mujeres y 13 hombres. El Gráfico 38 representa la distribución del recuento de linfocitos en sangre en función del género.

Gráfico 38. Linfocitos precirugía en función del género del paciente.

Nuestros resultados en GBM muestran recuentos de linfocitos en sangre superiores en hombres respecto a mujeres, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p=0,617$). En el grupo de los hombres el paciente G012 presentó un recuento de 6000/mm³ linfocitos, cifra muy superior a la media, el diagnostico de este paciente correspondía con un GBM *IDH* w/t. Ocurre lo mismo en el paciente G021, GBM *IDH* w/t del grupo de mujeres, que presentaba un recuento de 9400/mm³ linfocitos en la analítica previa a la cirugía.

5. DISCUSIÓN

5 DISCUSIÓN

Los gliomas son un grupo heterogéneo de tumores y, aunque son poco frecuentes en el adulto, suponen un importante problema de salud, sobre todo el GBM, que representa la forma más agresiva y frecuente de tumor cerebral primario. Generan deterioro funcional en el paciente y la escasez de opciones terapéuticas eficaces hace que el diagnóstico de glioma de alto grado se acompañe de un mal pronóstico vital.

El MT cerebral resulta único en su composición teniendo en cuenta los componentes inmunes y no inmunes que lo forman. De hecho, múltiples estudios recientes apoyan la idea de que el MT cerebral es un regulador fundamental de la progresión tanto de los gliomas como de las metástasis cerebrales de otros tumores primarios (111). Sin embargo, nuestro conocimiento del MT cerebral está restringido a tipos de tumores cerebrales o compartimentos celulares concretos y carece de un análisis completo e integrador en gliomas (112). Los estudios hasta la fecha describen una importante depleción linfocitaria y la presencia de macrófagos en los GBM. Sin embargo, los gliomas de bajo grado son neoplasias con escasa actividad inmunológica con muy bajo infiltrado linfocitario, por lo cual son denominados “tumores fríos” (113). En definitiva, el MT de los gliomas de alto grado contiene una proporción sustancial de células no neoplásicas cuya importancia reside en la capacidad que poseen para dar soporte a las células de glioma, evitar una respuesta inmune eficaz y favorecer la progresión y agresividad de dichos tumores (114).

Una de las características moleculares más destacadas y diferenciadoras de los gliomas, y que incluso condiciona su clasificación, son las mutaciones en *IDH1/2*. Estas se encuentran hasta en el 80% de los LGG (grado II y III) y en un subgrupo de gliomas de alto grado (grado IV, GBM) (115,116) que suponen en torno al 10% del total. Los pacientes con gliomas *IDH1/2* mutados presentan supervivencias más prolongadas y mejores respuestas a los tratamientos estándar con radioterapia y agentes alquilantes. Esto puede ser consecuencia del efecto del 2-HG, metabolito que se acumula en presencia de *IDH1/2* mutante, sobre la expresión génica y la consecuente regulación que *IDH* ejerce sobre el MT. Los datos presentados en esta tesis, relativos al análisis de supervivencia en función del estatus de *IDH* (mutado vs. w/t) confirman los resultados publicados hasta la fecha y dan luz a las importantes diferencias en el MT entre los gliomas. En nuestra cohorte, la SG y SLP fueron superiores en los gliomas de cualquier grado con mutación

de *IDH* siendo las diferencias entre mutados y w/t estadísticamente significativas. A la lectura de los datos en enero 2021, y tras un seguimiento mediano de 22,8 meses, la supervivencia en los *IDH* mutados fue del 90% y solo del 47,4% en los *IDH* w/t. Estos datos están de acuerdo con el efecto protector conocido de la mutación *IDH* en gliomas de distintos grados (14).

El objetivo principal del presente trabajo era realizar una descripción cualitativa y cuantitativa del infiltrado inmune que rodea a los gliomas de distintos grados teniendo en cuenta sus alteraciones moleculares y describiendo que las mutaciones en *IDH* en gliomas humanos conllevan una reducción del infiltrado inflamatorio asociado, de acuerdo con resultados preclínicos anteriores (117). La descripción detallada de la población inmune que forma el microambiente de estos tumores mostró que la presencia de mutaciones en *IDH1/2*, independientemente del grado histológico, predice un infiltrado inmune bajo, y de características específicas, tanto en el componente linfoide como mieloide respecto a los tumores *IDH* no mutados. Los GBM *IDH* mutados se asemejan en el infiltrado linfoide y mieloide más a los tumores de bajo grado que al resto de los GBM w/t. Esto demuestra que la mutación de *IDH* condiciona de forma primordial al microambiente tumoral. Asimismo, nuestros resultados muestran que dentro del grupo de pacientes con GBM *IDH* w/t existen dos grupos diferenciados por su infiltrado, uno de los cuales presenta un bajo contenido de células inmunes, con porcentajes muy similares a los observados en los gliomas *IDH* mutados, y otro en el que las células inmunes, CD45+, representan en torno a la mitad del contenido tumoral (GBM WThi). Este segundo grupo contiene una mayor proporción de linfocitos T del tipo Treg, macrófagos y MDSC, poco eficientes en el reconocimiento y activación inmune. El grupo de gliomas *IDH*mut muestra un infiltrado escaso para todos los tipos celulares estudiados, el porcentaje de neutrófilos, MDSC, macrófagos y Tregs esta disminuido respecto a lo observado en los WThi. Cabe señalar que las diferencias encontradas para cada tipo celular no fueron en todos los casos estadísticamente significativas, no obstante, nuestros resultados están de acuerdo con datos de expresión génica reportados a partir de muestras del TCGA que han mostrado una expresión reducida de genes asociados a linfocitos T citotóxicos en gliomas *IDH* mutados en comparación con w/t (118).

En nuestro trabajo, no se encontraron diferencias en el contenido de microglía, que fue muy homogénea en los diferentes grupos de gliomas. Esto estaría en desacuerdo con algunos trabajos publicados a partir del estudio de modelos murinos de glioma. En

ellos se describe la reducción de varios tipos celulares, incluyendo la microglía, en los tumores *IDH* mutados en relación con una producción reducida de quimiocinas (117). Sin embargo, estudios más recientes que utilizan un abordaje multi-dimensional sugieren que la microglía es el componente mayoritario del microambiente inmune de los gliomas *IDH* mutados, lo que estaría de acuerdo con nuestros resultados en los que vemos mayor expresión en comparación con el tejido cerebral normal (112, 119). Se podría especular que la microglía, que se origina en el mesodermo y migra al SNC durante el desarrollo embrionario (7), permanece en estado quiescente hasta que se activa en respuesta a señales celulares del medio (por ejemplo, la generadas por un tumor). Consideramos que la activación de la microglía podría ser inespecífica y esto explicaría por qué se ve aumentada su presencia para todos los gliomas en comparación con tejido cerebral sano y quizá por qué no existen diferencias entre los distintos grupos de gliomas ya que estas células no son reclutadas si no residentes del SNC. Sin embargo, no existe aún una explicación experimental de este fenómeno que describimos y los resultados de los estudios llevados a cabo en gliomas humanos con el objetivo de distinguir dentro de los TAMs las células de origen microglial de los monocitos reclutados del torrente sanguíneo resultan a veces contradictorios (6). Una mejora en los marcadores específicos de cada subtipo de macrófago, así como estudios espaciales de la localización de estas células en los distintos gliomas, podría aclarar estas diferencias encontradas.

La reducción del infiltrado inflamatorio en los *IDH* mutados, en especial sobre el contenido en macrófagos, podría relacionarse con la menor agresividad de los gliomas (6,114) ya que en el MT las células linfoides y mieloides, y en especial estas últimas, contribuyen a la proliferación y supervivencia de las células tumorales. De hecho, en este estudio se ha llevado a cabo el análisis de supervivencia en función, no solo de *IDH*, si no también atendiendo a las características del infiltrado inmune tumoral bajo vs. alto (WTlo vs. WThi). Como ya hemos comentado, la SG fue superior para los gliomas *IDH* mutados respecto a los w/t. Entre los grupos WTlo y WThi, los resultados en términos de supervivencia fueron diferentes a los esperados, mostrando mejor SG los gliomas WThi. No obstante, estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas por lo que podrían ser debidas al azar por el tamaño de la muestra o el tiempo de seguimiento. En cualquier caso, los datos sugieren que dentro de los GBM *IDHwt*, no parecen ser más agresivos los tumores con mayor contenido en células inmunes, lo que coincide con lo que han visto otros investigadores (120). Nuestro análisis del contenido de células

inmunes del microambiente del glioma muestra una composición heterogénea que está de acuerdo con la visión general de este tipo de tumor y, sobre todo, con la acusada necesidad de una estratificación de los gliomas en subgrupos más homogéneos en función de su biología para poder desarrollar terapias funcionales. Otro punto a comentar es la expresión de PD-L1, que ha sido descrito como molécula clave en el control inmune tumoral. Esta proteína es expresada en la superficie de las células mieloides y las células tumorales y su unión con PD-1 (expresado en la superficie de los linfocitos) suprime la actividad de las células T efectoras, produciendo inmunosupresión en el MT. En la actualidad, el bloqueo de esta unión a partir de anticuerpos monoclonales es foco de desarrollo de numerosas terapias oncológicas. Los resultados de nuestro trabajo muestran que, en los gliomas, PD-L1 se expresa fundamentalmente en las células inflamatorias y no en las células tumorales. Además, otro dato importante del presente estudio es que no se han encontrado diferencias en la cantidad de células tumorales que expresan altos niveles de PD-L1 entre los diferentes subgrupos de gliomas (*IDH* mutado, WTlo y WThi), que fue muy baja en los tres grupos definidos. La baja expresión de PD-L1 por parte de las células de glioma podría estar relacionada con la ausencia de eficacia, hasta la fecha, de los anticuerpos anti- PD-1 y anti- PD-L1 en los GBM. Por el momento la inmunoterapia ha demostrado resultados negativos en el primer ensayo clínico fase III con nivolumab en GBM recurrente, donde ni siquiera los pacientes con expresión de PD-L1 >1% presentaron beneficio al tratamiento con anti- PD-1 (121). Además de esta baja expresión de PD-L1 en las células tumorales y su expresión en células inflamatorias, podría haber otras causas del fracaso de la inmunoterapia en gliomas. En este sentido, es necesario mejorar el conocimiento de la respuesta inmune en estos tumores y la importancia de las células mieloides en dicho escenario, debido a que son un fuerte freno para el reclutamiento de células T con capacidad de hacer efectiva una respuesta inmune antitumoral. Hasta la fecha disponemos de trabajos publicados donde se estudia la expresión de PD-1 en los TAM intentando revelar las consecuencias de su expresión en la inmunidad antitumoral. La expresión de PD-1 en los TAM se correlaciona negativamente con el potencial fagocítico de estas células contra las células tumorales (122). En modelos tumorales murinos de cáncer de colon el bloqueo de PD-1/PD-L1 aumentó la fagocitosis por macrófagos de las células cancerosas reduciendo el crecimiento tumoral y mejorando la supervivencia (122). Esto abriría la puerta a la posibilidad de que las terapias PD-1/PD-L1 puedan funcionar a partir de un efecto directo sobre los macrófagos del MT.

Teniendo en cuenta la importancia de la mutación de *IDH* en el desarrollo de estos tumores, no es de extrañar que se hayan llevado a cabo numerosos trabajos alrededor de tratamientos con inhibidores de *IDH*, solos o en combinación con inmunoterapia. Algunos inhibidores de *IDH1/2* han demostrado efectos beneficiosos en estudios preclínicos (123) y en la actualidad hay ensayos clínicos en marcha con el objetivo de identificar los inhibidores adecuados. En este sentido es interesante destacar que trabajos en modelos de glioma de ratón han mostrado que la introducción de la mutación en *IDH* reduce los niveles de la citoquina CXCL10, asociándose con disminución de la producción de STAT1, un regulador de CXCL10 y con menor proporción de células T en el infiltrado tumoral, como nosotros hemos mostrado que ocurre en humanos en el presente trabajo. Este efecto se pudo revertir con un inhibidor de *IDH1* (*IDH-C35*) que ayudó a mejorar el tratamiento con inmunoterapia en estos ratones (118). Aunque son necesarias más investigaciones, estos resultados plantean la posibilidad de que quizá la combinación de inhibidores de *IDH* con inhibidores del punto de control inmune pueda reportar algún beneficio mejorando la eficacia de la inmunoterapia tras revertir el mecanismo de evasión inmune que presentan los gliomas *IDH* mutados.

Respecto al estudio de poblaciones inmunes en sangre periférica, este ha sido un tema de interés durante años por la ausencia de marcadores que ayuden en el diagnóstico y seguimiento de los gliomas. Para el desarrollo de un marcador es necesario determinar los grupos clínicos que queremos separar (por ejemplo: progresión de pacientes de grado inferior a GBM o discriminar entre distintos grados histológicos), además la precisión del biomarcador debe ser suficientemente alta y debe medir exactamente la diferencia entre los grupos clínicamente relevantes sin la contribución de variables de confusión y siendo resistente a factores inter e intraindividuales (98). En el presente trabajo, se llevó a cabo el estudio de poblaciones celulares en sangre periférica al diagnóstico de glioma en los 29 pacientes incluidos. De forma global los recuentos de leucocitos, linfocitos y monocitos fueron superiores en los pacientes con tumores grado III y IV respecto a los pacientes diagnosticados de gliomas grado II, pero estas diferencias solo fueron estadísticamente significativas para los monocitos. En el caso de los neutrófilos ocurría lo contrario y el recuento se ve disminuido en los pacientes con tumores grado IV respecto a los pacientes con tumores de menor grado histológico. En cuanto a las diferencias en los linfocitos en sangre de los pacientes 20 pacientes con GBM las cifras de linfocitos previas a la resección tumoral fueron superiores en el grupo *IDH WT*lo en comparación

con las cifras en los pacientes con tumores *IDH* WThi o *IDH* mutados. El recuento de linfocitos fue también superior en hombres que, en mujeres, pero la ausencia de significación estadística en los resultados anteriores nos impide sacar conclusiones sólidas. Las células mieloides representan un componente principal del MT de GBM y las MDSC son más abundantes en sangre periférica en los pacientes con GBM en comparación con aquellos con gliomas de bajo grado. Además, un incremento de MDSC en el MT, con su efecto conocido de bloqueo de la respuesta inmune antitumoral, se asocia con peor pronóstico en GBM (124, 125, 126). Los datos en conjunto no muestran solidez estadística, pero si apoyan el desarrollo de estudios similares en cohortes con mayor número de pacientes ya que muestran una importancia clínica.

En definitiva, nuestro trabajo estudia en profundidad las características del infiltrado inmune en gliomas atendiendo a su perfil molecular. Estos resultados podrían, a futuro, respaldar la subclasificación de los pacientes con glioma en búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas al complejo microambiente que rodea al tumor, permitiendo establecer grupos más homogéneos donde obtener mejores resultados en supervivencia.

6. CONCLUSIONES

6 CONCLUSIONES

1. Los gliomas con y sin mutación en *IDH*, no sólo tienen pronósticos y respuestas al tratamiento diferentes, sino que también presentan un perfil inmune muy distinto que podría condicionar enfoques diferenciados en el desarrollo de terapias futuras.
2. En el estudio de la población linfocitaria en el MT, los gliomas *IDH* w/t tienen un mayor número de células inflamatorias que los *IDH* mutados, independientemente del grado tumoral. Dentro del grupo de gliomas *IDH* w/t hay un subgrupo con bajo infiltrado inmune (*IDH* WTlo) de características similares al que presentan los *IDH* mutados. Este subgrupo con bajo infiltrado no parece, *a priori*, menos agresivo que el subgrupo *IDH*wt con alto infiltrado inmune (*IDH* wt_hi).
3. Existen, además, entre las células inmunes infiltradas de los gliomas *IDH* mutados y w/t, diferencias cualitativas destacables. En los *IDH* WThi el infiltrado inmune se caracteriza por una mayor proporción de linfocitos T del tipo Treg, no T efector, así como macrófagos y MDSC que son poco eficientes en el reconocimiento e impiden la activación inmune y la consecuente eliminación de células tumorales. En contraposición, los gliomas *IDH* mutados y WTlo se caracterizan porque su porcentaje de neutrófilos, MDSC, macrófagos y Tregs en el infiltrado tumoral está disminuido respecto a lo observado en los WThi.
4. La expresión de PD-L1 es muy baja en las células tumorales en todos los tipos de gliomas, siendo mucho más elevada en las células inmunes presentes en el MT.
5. El análisis de los recuentos de las poblaciones linfoides y mieloides en sangre periférica al diagnóstico de glioma no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tipos de gliomas ni tampoco permite, en este análisis, utilizar estos valores como marcadores pronóstico o del grado histológico.

7. MATERIAL SUPLEMENTARIO

7 MATERIAL SUPLEMENTARIO

7.1 Base de datos

A continuación, se expone la base de datos utilizada para el desarrollo de este trabajo. Fue realizada utilizando el programa Microsoft Excel 2016 pero su impresión se ha realizado utilizando MS Word 2000. Los códigos utilizados para su elaboración son:

- **Número:** Número de orden asignado a cada caso del estudio.
- **Fecha de nacimiento.**
- **Género:** hombre vs. mujer (0= hombre; 1=mujer).
- **Edad dx.:** Edad en el momento del diagnóstico en años.
- **Fecha de dx:** fecha de cirugía.
- **Dx histológico:** astrocitoma vs. oligodendroglioma (0=astrocitoma; 1=oligodendroglioma.)
- **Grado de anatomía patológica inicial:** I, II, III, IV (0=I; 1=II; 2=III y 3=IV)
- **Grado de resección:** grado de resección del tumor en la cirugía total o subtotal vs. parcial (0=total o subtotal; 1=parcial).
- **KPS inicial, al dx:** estado general del paciente según KPS tras la cirugía de resección (0=100; 1=90; 2=80; 3= 70 o menor).
- **Estado de IDH:** mutado vs. no mutado (0=mutado; 1=no mutado).
- **Estado de MGMT:** metilado vs. no metilado vs. no realizado (0=metilado; 1=no metilado; 2=no realizado).
- **Estado de ATRX:** mutado vs. no mutado (0=mutado; 1=no mutado).
- **TERT:** telomerase reverse transcription (0= mutado; 1= no mutado).
- **Infiltrado inmune:** alto (hi) vs. bajo (lo) (0=lo; 1=hi)
- **PD:** progresión de la enfermedad si vs. no en función de si el paciente ha progresado durante el tiempo de seguimiento.
- **Fecha de PD o fecha de último seguimiento:** fecha de progresión de la enfermedad en aquellos que han progresado y fecha de último seguimiento en los que no.
- **Fallecimiento:** fallecimiento del paciente durante el tiempo de seguimiento (0=sí; 1=no).
- **Fecha último seguimiento o fecha de fallecimiento.**

- **Tiempo de seguimiento:** en meses, desde el diagnóstico hasta el fallecimiento vs. último seguimiento en caso de que el paciente no haya fallecido.
- **SLP:** Supervivencia Libre de Progresión que es el tiempo en meses desde el diagnóstico hasta que el paciente muestra progresión de la enfermedad o hasta la fecha de último seguimiento en caso de no PD.
- **SG:** Supervivencia Global que es el tiempo en meses desde el diagnóstico hasta que el paciente fallece o hasta la fecha de último seguimiento en caso de que no haya fallecido.
- **SP precirugía:** fecha de extracción de sangre periférica en los días previos a cirugía de resección del tumor.
- **Leucocitos precirugía:** recuento en valor absoluto de los leucocitos en SP previo a resección del tumor.
- **Neutrófilos precirugía:** recuento en valor absoluto de los neutrófilos en SP previo a resección del tumor.
- **Linfocitos precirugía:** recuento en valor absoluto de los linfocitos en SP previo a resección del tumor.
- **Monocitos precirugía:** recuento en valor absoluto de los monocitos en SP previo a resección del tumor.

8. BIBLIOGRAFÍA

8 BIBLIOGRAFÍA

- 1.-Ransohoff RM, Cardona AE. The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature*. 2010;468(7321):253-62.
- 2.-Azarfar A, Calcini N, Huang C, Zeldenrust F, Celikel T. Neural coding: A single neuron's perspective. *Neurosci Biobehav Rev*. 2018;94:238-247.
- 3.-Adams KL, Gallo V. The diversity and disparity of the glial scar. *Nat Neurosci*. 2018;21(1):9-15.
- 4.-Ponath G, Park C, Pitt D. The Role of Astrocytes in Multiple Sclerosis. *Front Immunol*. 2018;9:217.
- 5.-Peferoen L, Kipp M, van der Valk P, van Noort JM, Amor S. Oligodendrocyte-microglia cross-talk in the central nervous system. *Immunology*. 2014;141(3):302-13.
- 6.-Hambardzumyan D, Gutmann DH, Kettenmann H. The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. *Nat Neurosci*. 2016;19(1):20-7.
- 7.-Smolders SM-T, Kessels S, Vangansewinkel T, Rigo J-M, Legendre P, Brône B. Microglia: Brain cells on the move. *Prog Neurobiol*. 2019;178:101612.
- 8.-Martínez-García M, Álvarez-Linera J, Carrato C, Ley L, Luque R, Maldonado X, et al. SEOM clinical guidelines for diagnosis and treatment of glioblastoma (2017). *Clin Transl Oncol*. 2018;20(1):22-8.
- 9.-Dang M, Phillips PC. Pediatric Brain Tumors. *Continuum (Minneap Minn)*. 2017(6, Neuro-oncology):1727-1757.
- 10.-Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2007;114(2):97-109.
- 11.-Schiff D. Low-grade Gliomas. *Continuum (Minneap Minn)*. 2017;23(6, Neuro-oncology):1564-1579.
- 12.-Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2016;131(6):803-20.
- 13.-Pignatti F, van den Bent M, Curran D, Debruyne C, Sylvester R, Therasse P, et al. Prognostic factors for survival in adult patients with cerebral low-grade glioma. *J Clin Oncol*. 2002;20(8):2076-84.
- 14.-Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med*. 2009;360(8):765-73.

- 15.-Vuorinen V, Hinkka S, Färkkilä M, Jääskeläinen J. Debulking or biopsy of malignant glioma in elderly people—a randomised study. *Acta Neurochir (Wien)*. 2003;145(1):5-10.
- 16.-Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352(10):987-96.
- 17.-Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol*. 2009;10(5):459-66.
- 18.-Eskilsson E, Røslund GV, Solecki G, Wang Q, Harter PN, Graziani G, et al. EGFR heterogeneity and implications for therapeutic intervention in glioblastoma. *Neuro Oncol*. 2018;20(6):743-752.
- 19.-Sepúlveda JM, Belda-Iniesta C, Gil-Gil M, Pérez-Segura P, Berrocal A, Reynés G, et al. A phase II study of feasibility and toxicity of bevacizumab in combination with temozolomide in patients with recurrent glioblastoma. *Clin Transl Oncol*. 2015;17(9):743-50.
- 20.-Diaz RJ, Ali S, Qadir MG, De La Fuente MI, Ivan ME, Komotar RJ. The role of bevacizumab in the treatment of glioblastoma. *J Neurooncol*. 2017;133(3):455-67.
- 21.-Viallard C, Larrivée B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis*. 2017;20(4):409-26.
- 22.-Sampson JH, Maus MV, June CH. Immunotherapy for Brain Tumors. *J Clin Oncol*. 2017;35(21):2450-2456.
- 23.-Drake CG, Jaffee E, Pardoll DM. Mechanisms of immune evasion by tumors. *Adv Immunol*. 2006;90:51-81.
- 24.-Chen L, Han X. Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present, and future. *J Clin Invest*. 2015;125(9):3384-91.
- 25.-Weber JS, D'Angelo SP, Minor D, Hodi FS, Gutzmer R, Neyns B, et al. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2015;16(4):375-84.
- 26.-Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med*. 2015;373(1):23-34.
- 27.-Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2015;373(17):1627-39.

- 28.-Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crinò L, Eberhardt WE, Poddubskaya E, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2015;373(2):123-35.
- 29.-Kvistborg P, Philips D, Kelderman S, Hageman L, Ottensmeier C, Joseph-Pietras D, et al. Anti-CTLA-4 therapy broadens the melanoma-reactive CD8⁺ T cell response. *Sci Transl Med*. 2014;6(254):254ra128.
- 30.-Reardon DA, Omuro A, Brandes AA, Rieger J, Wick A, Sepulveda J, et al. OS10.3 Randomized Phase 3 Study Evaluating the Efficacy and Safety of Nivolumab vs Bevacizumab in Patients With Recurrent Glioblastoma: CheckMate 143. *Neuro-Oncol*. 2017;19(suppl_3):iii21-iii21.
- 31.-Saloman JL, Cohen JA, Kaplan DH. Intimate neuro-immune interactions: breaking barriers between systems to make meaningful progress. *Curr Opin Neurobiol*. 2019;62:60-7.
- 32.-Waisman A, Lukas D, Clausen BE, Yogev N. Dendritic cells as gatekeepers of tolerance. *Semin Immunopathol*. 2017;39(2):153-63.
- 33.-Filley AC, Henriquez M, Dey M. Recurrent glioma clinical trial, CheckMate-143: the game is not over yet. *Oncotarget*. 2017;8(53):91779-91794.
- 34.-Tomaszewski W, Sanchez-Perez L, Gajewski TF, Sampson JH. Brain Tumor Microenvironment and Host State: Implications for Immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 2019;25(14):4202-4210.
- 35.-Haddad-Tóvolli R, Dragano NRV, Ramalho AFS, Velloso LA. Development and Function of the Blood-Brain Barrier in the Context of Metabolic Control. *Front Neurosci*. 2017;11:224.
- 36.-Woroniecka KI, Rhodin KE, Chongsathidkiet P, Keith KA, Fecci PE. T-cell Dysfunction in Glioblastoma: Applying a New Framework. *Clin Cancer Res*. 2018;24(16):3792-3802.
- 37.-Fecci PE, Mitchell DA, Whitesides JF, Xie W, Friedman AH, Archer GE, et al. Increased regulatory T-cell fraction amidst a diminished CD4 compartment explains cellular immune defects in patients with malignant glioma. *Cancer Res*. 2006;66(6):3294-302.
- 38.-Roszman TL, Brooks WH, Steele C, Elliott LH. Pokeweed mitogen-induced immunoglobulin secretion by peripheral blood lymphocytes from patients with primary intracranial tumors. Characterization of T helper and B cell function. *J Immunol*. 1985;134(3):1545-50.
- 39.-Elliott LH, Brooks WH, Roszman TL. Cytokinetic basis for the impaired activation of lymphocytes from patients with primary intracranial tumors. *J Immunol*. 1984;132(3):1208-15.
- 40.-Constam DB, Philipp J, Malipiero UV, Dijke P ten, Schachner M, Fontana A. Differential expression of transforming growth factor-beta 1, -beta 2, and -beta 3 by glioblastoma cells, astrocytes, and microglia. *J Immunol*. 1992;148(5):1404-10.

- 41.-Huettner C, Paulus W, Roggendorf W. Messenger RNA expression of the immunosuppressive cytokine IL-10 in human gliomas. *Am J Pathol.* 1995;146(2):317-22.
- 42.-Takeshima H, Kuratsu J-I, Takeya M, Yoshimura T, Ushio Y. Expression and localization of messenger RNA and protein for monocyte chemoattractant protein-1 in human malignant glioma. *J Neurosurg.* 1994;80(6):1056-62.
- 43.-Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, et al. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol.* 2002;169(5):2756-61.
- 44.-Shinohara H, Yagita H, Ikawa Y, Oyaizu N. Fas drives cell cycle progression in glioma cells via extracellular signal-regulated kinase activation. *Cancer Res.* 2000;60(6):1766-72.
- 45.-Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:677-704.
- 46.-Caccese M, Indraccolo S, Zagonel V, Lombardi G. PD-1/PD-L1 immune-checkpoint inhibitors in glioblastoma: A concise review. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2019;135:128-134.
- 47.-Nduom EK, Wei J, Yaghi NK, Huang N, Kong L-Y, Gabrusiewicz K, et al. PD-L1 expression and prognostic impact in glioblastoma. *Neuro-Oncol.* 2016;18(2):195-205.
- 48.-Berghoff AS, Kiesel B, Widhalm G, Rajky O, Ricken G, Wöhrer A, et al. Programmed death ligand 1 expression and tumor-infiltrating lymphocytes in glioblastoma. *Neuro-Oncol.* 2015;17(8):1064-75.
- 49.-Bowman RL, Joyce JA. Therapeutic targeting of tumor-associated macrophages and microglia in glioblastoma. *Immunotherapy.* 2014;6(6):663-6.
- 50.-Yin J, Kim SS, Choi E, Oh YT, Lin W, Kim TH, et al. ARS2/MAGL signaling in glioblastoma stem cells promotes self-renewal and M2-like polarization of tumor-associated macrophages. *Nat Commun.* 2020;11(1):2978.
- 51.-Coniglio SJ, Segall JE. Review: Molecular mechanism of microglia stimulated glioblastoma invasion. *Matrix Biol.* 2013;32(7):372-80.
- 52.-Chen Z, Hambardzumyan D. Immune Microenvironment in Glioblastoma Subtypes. *Front Immunol.* 2018;9:1004.
- 53.-Kmieciak J, Poli A, Brons NH, Waha A, Eide GE, Enger PØ. Elevated CD3+ and CD8+ tumor-infiltrating immune cells correlate with prolonged survival in glioblastoma patients despite integrated immunosuppressive mechanisms in the tumor microenvironment and at the systemic level. *J Neuroimmunol.* 2013; 264(1-2):71-83.

- 54.-Wiendl H, Mitsdoerffer M, Hofmeister V, Wischhusen J, Bornemann A, Meyermann R, et al. A Functional Role of HLA-G Expression in Human Gliomas: An Alternative Strategy of Immune Escape. *J Immunol.* 2002;168(9):4772-80.
- 55.-Li X, Wang B, Gu L, Zhang J, Li X, Gao L, et al. Tim-3 expression predicts the abnormal innate immune status and poor prognosis of glioma patients. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 2018;476:178-84.
- 56.-Locarno CV, Simonelli M, Carenza C, Capucetti A, Stanzani E, Lorenzi E, et al. Role of myeloid cells in the immunosuppressive microenvironment in gliomas. *Immunobiology.* 2020;151853.
- 57.-Woodworth GF, Dunn GP, Nance EA, Hanes J, Brem H. Emerging insights into barriers to effective brain tumor therapeutics. *Front Oncol.* 2014;4:126.
- 58.-Abbott NJ. Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *J Inherit Metab Dis.* 2013;36(3):437-49.
- 59.-Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M, Todaro M, Invernici G, Cenci T, et al. Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature.* 2010;468(7325):824-8.
- 60.-Charles N, Holland EC. The perivascular niche microenvironment in brain tumor progression. *Cell Cycle.* 2010;9(15):3012-21.
- 61.-Pietras A, Katz AM, Ekström EJ, Wee B, Halliday JJ, Pitter KL, et al. Osteopontin-CD44 Signaling in the Glioma Perivascular Niche Enhances Cancer Stem Cell Phenotypes and Promotes Aggressive Tumor Growth. *Cell Stem Cell.* 2014;14(3):357-69.
- 62.-Wolburg H, Noell S, Mack A, Wolburg-Buchholz K, Fallier-Becker P. Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. *Cell Tissue Res.* 2009;335(1):75-96.
- 63.-Sofroniew MV. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nat Rev Neurosci.* 2015;16(5):249-63.
- 64.-Quail DF, Bowman RL, Akkari L, Quick ML, Schuhmacher AJ, Huse JT, et al. The tumor microenvironment underlies acquired resistance to CSF-1R inhibition in gliomas. *Science.* 2016;352(6288):aad3018.
- 65.-Le DM, Besson A, Fogg DK, Choi K-S, Waisman DM, Goodyer CG, et al. Exploitation of astrocytes by glioma cells to facilitate invasiveness: a mechanism involving matrix metalloproteinase-2 and the urokinase-type plasminogen activator-plasmin cascade. *J Neurosci.* 2003;23(10):4034-43.
- 66.-Liu C, Sage JC, Miller MR, Verhaak RGW, Hippenmeyer S, Vogel H, et al. Mosaic analysis with double markers reveals tumor cell of origin in glioma. *Cell.* 2011;146(2):209-21.
- 67.-Venkatesh HS, Johung TB, Caretti V, Noll A, Tang Y, Nagaraja S, et al. Neuronal Activity Promotes Glioma Growth through Neuroligin-3 Secretion. *Cell.* 2015;161(4):803-16.

-
- 68.-Le Rhun E, Preusser M, Roth P, Reardon DA, van den Bent M, Wen P, et al. Molecular targeted therapy of glioblastoma. *Cancer Treat Rev.* 2019;80:101896.
- 69.-Salama AK, Hodi FS. Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4. *Clin Cancer Res.* 2011;17(14):4622-8.
- 70.-Johnson DB, Frampton GM, Rioth MJ, Yusko E, Xu Y, Guo X, et al. Targeted Next Generation Sequencing Identifies Markers of Response to PD-1 Blockade. *Cancer Immunol Res.* 2016;4(11):959-67.
- 71.-Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SA, Behjati S, Biankin AV, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature.* 2013; 500(7463):415-21.
- 72.-Cristescu R, Mogg R, Ayers M, Albright A, Murphy E, Yearley J, et al. Pan-tumor genomic biomarkers for PD-1 checkpoint blockade-based immunotherapy. *Science.* 2018;362(6411):eaar3593.
- 73.-Bloom K, Joglekar A. Towards building a chromosome segregation machine. *Nature.* 2010;463(7280):446-56.
- 74.-Lawrence M, Daujat S, Schneider R. Lateral Thinking: How Histone Modifications Regulate Gene Expression. *Trends Genet.* 2016;32(1):42-56.
- 75.-Oudet P, Gross-Bellard M, Chambon P. Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell.* 1975;4(4):281-300.
- 76.-Ciechomska IA, Jayaprakash C, Maleszewska M, Kaminska B. Histone Modifying Enzymes and Chromatin Modifiers in Glioma Pathobiology and Therapy Responses. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1202:259-279.
- 77.-Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis.* 2010;31(1):27-36.
- 78.-Vétizou M, Pitt JM, Daillère R, Lepage P, Waldschmitt N, Flament C, et al. Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science.* 2015;350(6264):1079-84.
- 79.-Jiménez-Sánchez A, Memon D, Pourpe S, Veeraraghavan H, Li Y, Vargas HA, et al. Heterogeneous Tumor-Immune Microenvironments among Differentially Growing Metastases in an Ovarian Cancer Patient. *Cell.* 2017;170(5):927-938.e20.
- 80.-Sivan A, Corrales L, Hubert N, Williams JB, Aquino-Michaels K, Earley ZM, et al. Commensal *Bifidobacterium* promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science.* 2015;350(6264):1084-9.
- 81.-Sajani K, Islam F, Smith RA, Gopalan V, Lam AK. Genetic alterations in Krebs cycle and its impact on cancer pathogenesis. *Biochimie.* 2017;135:164-72.
- 82.-Warburg O. On the Origin of Cancer Cells. *Science.* 1956;123(3191):309-14.

-
- 83.-Balañá C, Alonso M, Hernandez-Lain A, Pérez-Segura P, Pineda E, Ramos A, et al. SEOM clinical guidelines for anaplastic gliomas (2017). *Clin Transl Oncol*. 2018;20(1):16-21.
- 84.-Sepúlveda-Sánchez JM, Muñoz Langa J, Arráez MÁ, Fuster J, Hernández Laín A, Reynés G, et al. SEOM clinical guideline of diagnosis and management of low-grade glioma (2017). *Clin Transl Oncol*. 2018;20(1):3-15.
- 85.-Ochoa-Carrillo FJ, Bravo-Cuellar A. Macrophages, angels or demons. *GAMO Vol. 12 Núm. 1*, 2013 *Gaceta Mexicana de Oncología* [Internet].
- 86.-Solinas G, Schiarea S, Liguori M, Fabbri M, Pesce S, Zammataro L, et al. Tumor-Conditioned Macrophages Secrete Migration-Stimulating Factor: A New Marker for M2-Polarization, Influencing Tumor Cell Motility. *J Immunol*. 2010;185(1):642-52.
- 87.-Burnett GT, Weathersby DC, Taylor TE, Bremner TA. Regulation of Inflammation- and Angiogenesis-related Gene Expression in Breast Cancer Cells and Co-cultured Macrophages. *Anticancer Res*. 2008;28(4B):2093-9.
- 88.-Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 2004;25(12):677-86.
- 89.-Budhu A, Forgues M, Ye Q-H, Jia H-L, He P, Zanetti KA, et al. Prediction of venous metastases, recurrence, and prognosis in hepatocellular carcinoma based on a unique immune response signature of the liver microenvironment. *Cancer Cell*. 2006;10(2):99-111.
- 90.-Zeiner PS, Preusse C, Golebiewska A, Zinke J, Iriondo A, Muller A, et al. Distribution and prognostic impact of microglia/macrophage subpopulations in gliomas. *Brain Pathol*. 2019;29(4):513-529.
- 91.-Shah W, Yan X, Jing L, Zhou Y, Chen H, Wang Y. A reversed CD4/CD8 ratio of tumor-infiltrating lymphocytes and a high percentage of CD4(+)FOXP3(+) regulatory T cells are significantly associated with clinical outcome in squamous cell carcinoma of the cervix. *Cell Mol Immunol*. 2011; 8(1):59-66.
- 92.-Han S, Zhang C, Li Q, Dong J, Liu Y, Huang Y, et al. Tumour-infiltrating CD4 + and CD8 + lymphocytes as predictors of clinical outcome in glioma. *Br J Cancer*. 2014;110(10):2560-8.
- 93.-Pérez-Cruz PE, Acevedo F. Performance status scale in cancer. *Gastroenterol. latinoam* 2014; Vol 25:8., N° 3: 219-226
- 94.-Tian M, Ma W, Chen Y, Yu Y, Zhu D, Shi J, et al. Impact of gender on the survival of patients with glioblastoma. *Biosci Rep*. 2018;38(6):BSR20180752.
- 95.-Yang D, Hendifar A, Lenz C, Togawa K, Lenz F, Lurje G, et al. Survival of metastatic gastric cancer: Significance of age, sex and race/ethnicity. *J Gastrointest Oncol*. 2011;2(2):77-84.

- 96.-Hendifar A, Yang D, Lenz F, Lurje G, Pohl A, Lenz C, et al. Gender Disparities in Metastatic Colorectal Cancer Survival. *Clin Cancer Res.* 2009;15(20):6391-7.
- 97.-Mahaley MS Jr, Brooks WH, Roszman TL, Bigner DD, Dudka L, Richardson S. Immunobiology of primary intracranial tumors. Part 1: studies of the cellular and humoral general immune competence of brain-tumor patients. *J Neurosurg.* 1977;46(4):467-76.
- 98.-Ali H, Harting R, de Vries R, Ali M, Wurdinger T, Best MG. Blood-Based Biomarkers for Glioma in the Context of Gliomagenesis: A Systematic Review. *Front Oncol.* 2021 Jun 4;11:665235.
- 99.- Maas SLN, Draaisma K, Snijders TJ, Senders JT, Berendsen S, Seute T, et al. Routine Blood Tests Do Not Predict Survival in Patients with Glioblastoma-Multivariable Analysis of 497 Patients. *World Neurosurg.* 2019;126:e1081-e1091.
- 100.-Löhr M, Freitag B, Technau A, Krauss J, Monoranu CM, Rachor J, et al. High-grade glioma associated immunosuppression does not prevent immune responses induced by therapeutic vaccines in combination with T_{reg} depletion. *Cancer Immunol Immunother.* 2018;67(10):1545-1558.
- 101.-Zheng SH, Huang JL, Chen M, Wang BL, Ou QS, Huang SY. Diagnostic value of preoperative inflammatory markers in patients with glioma: a multicenter cohort study. *J Neurosurg.* 2018;129(3):583-592.
- 102.-Fossati G, Ricevuti G, Edwards SW, Walker C, Dalton A, Rossi ML. Neutrophil infiltration into human gliomas. *Acta Neuropathol.* 1999;98(4):349-54. 103.
- 103.-Liu S, Zhu Y, Zhang C, Meng X, Sun B, Zhang G, et al. The Clinical Significance of Soluble Programmed Cell Death-Ligand 1 (sPD-L1) in Patients With Gliomas. *Front Oncol.* 2020;10:9.
- 104.-Mostafa H, Pala A, Högel J, Hlavac M, Dietrich E, Westhoff MA, et al. Immune phenotypes predict survival in patients with glioblastoma multiforme. *J Hematol Oncol.* 2016;9(1):77.
- 105.-Pierscianek D, Ahmadipour Y, Michel A, Chihi M, Oppong MD, Kebir S, et al. Preoperative Survival Prediction in Patients With Glioblastoma by Routine Inflammatory Laboratory Parameters. *Anticancer Res.* 2020;40(2):1161-1166.
- 106.-Schernberg A, Nivet A, Dhermain F, Ammari S, Escande A, Pallud J, et al. Neutrophilia as a biomarker for overall survival in newly diagnosed high-grade glioma patients undergoing chemoradiation. *Clin Transl Radiat Oncol.* 2018;10:47-52.
- 107.-Kayhan A, Korkmaz TS, Baran O, Kemerdere R, Yeni SN, Tanriverdi T. Preoperative Systemic Inflammatory Markers in Different Brain Pathologies: An Analysis of 140 Patients. *Turk Neurosurg.* 2019;29(6):799-803.
- 108.-Adachi-Hayama M, Adachi A, Shinozaki N, Matsutani T, Hiwasa T, Takiguchi M, et al. Circulating anti-filamin C autoantibody as a potential serum biomarker for low-grade gliomas. *BMC Cancer.* 2014;14:452.

- 109.-Wang Z, Zhong L, Li G, Huang R, Wang Q, Wang Z, et al. Pre-treatment neutrophils count as a prognostic marker to predict chemotherapeutic response and survival outcomes in glioma: a single-center analysis of 288 cases. *Am J Transl Res.* 2020;12(1):90-104.
- 110.-Capper D, von Deimling A, Brandes AA, Carpentier AF, Kesari S, Sepulveda-Sanchez JM, et al. Biomarker and Histopathology Evaluation of Patients with Recurrent Glioblastoma Treated with Galunisertib, Lomustine, or the Combination of Galunisertib and Lomustine. *Int J Mol Sci.* 2017;18(5):995.
- 111.-Quail DF, Joyce JA. The Microenvironmental Landscape of Brain Tumors. *Cancer Cell.* 2017;31(3):326-341.
- 112.-Klemm F, Maas RR, Bowman RL, Kornete M, Soukup K, Nassiri S, et al. Interrogation of the Microenvironmental Landscape in Brain Tumors Reveals Disease-Specific Alterations of Immune Cells. *Cell.* 2020;181(7):1643-1660.e17.
- 113.-Thorsson V, Gibbs DL, Brown SD, Wolf D, Bortone DS, Ou Yang TH, et al. The Immune Landscape of Cancer. *Immunity.* 2018;48(4):812-830.e14.
- 114.-Roesch S, Rapp C, Dettling S, Herold-Mende C. When Immune Cells Turn Bad-Tumor-Associated Microglia/Macrophages in Glioma. *Int J Mol Sci.* 2018;19(2):436.
- 115.-Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science.* 2008;321(5897):1807-12.
- 116.-Brat DJ, Verhaak RG, Aldape KD, Yung WK, Salama SR, Cooper LA, et al. Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *N Engl J Med.* 2015;372(26):2481-98.
- 117.-Amankulor NM, Kim Y, Arora S, Kargl J, Szulzewsky F, Hanke M, et al. Mutant IDH1 regulates the tumor-associated immune system in gliomas. *Genes Dev.* 2017;31(8):774-786.
- 118.-Kohanbash G, Carrera DA, Shrivastav S, Ahn BJ, Jahan N, Mazor T, et al. Isocitrate dehydrogenase mutations suppress STAT1 and CD8+ T cell accumulation in gliomas. *J Clin Invest.* 2017;127(4):1425-1437.
- 119.-Friebel E, Kapolou K, Unger S, Núñez NG, Utz S, Rushing EJ, et al. Single-Cell Mapping of Human Brain Cancer Reveals Tumor-Specific Instruction of Tissue-Invasive Leukocytes. *Cell.* 2020;181(7):1626-1642.e20.
- 120.-Jeanmougin M, Håvik AB, Cekaite L, Brandal P, Sveen A, Meling TR, et al. Improved prognostication of glioblastoma beyond molecular subtyping by transcriptional profiling of the tumor microenvironment. *Mol Oncol.* 2020;14(5):1016-1027.
- 121.-Reardon DA, Brandes AA, Omuro A, Mulholland P, Lim M, Wick A, et al. Effect of Nivolumab vs Bevacizumab in Patients With Recurrent Glioblastoma: The

-
- CheckMate 143 Phase 3 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 2020;6(7):1003-1010.
- 122.-Gordon SR, Maute RL, Dulken BW, Hutter G, George BM, McCracken MN, et al. PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity. *Nature.* 2017;545(7655):495-499.
- 123.-Huang J, Yu J, Tu L, Huang N, Li H, Luo Y. Isocitrate Dehydrogenase Mutations in Glioma: From Basic Discovery to Therapeutics Development. *Front Oncol.* 2019;9:506.
- 124.-Raychaudhuri B, Rayman P, Ireland J, Ko J, Rini B, Borden EC, et al. Myeloid-derived suppressor cell accumulation and function in patients with newly diagnosed glioblastoma. *Neuro Oncol.* 2011;13(6):591-9.
- 125.-Alban TJ, Alvarado AG, Sorensen MD, Bayik D, Volovetz J, Serbinowski E, et al. Global immune fingerprinting in glioblastoma patient peripheral blood reveals immune-suppression signatures associated with prognosis. *JCI Insight.* 2018;3(21):e122264.
- 126.-Gielen PR, Schulte BM, Kers-Rebel ED, Verrijp K, Bossman SA, Ter Laan M, et al. Elevated levels of polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in patients with glioblastoma highly express S100A8/9 and arginase and suppress T cell function. *Neuro Oncol.* 2016;18(9):1253-64.