

Perfilamiento genómico exhaustivo y su utilidad como factor pronóstico de respuesta en pacientes con gliomas de alto grado a la segunda recaída

Investigador principal

León Darío Ortiz Gómez

Director

Ronald Guillermo Peláez Sánchez PhD

Cotutores

Heidy Johanna Contreras Martínez PhD

David Andrés Galvis Pareja PhD

Escuela de Graduados

Doctorado Ciencias de la Salud

Grupo de investigación

Ciencias farmacéuticas

Línea de investigación

Biotecnología y bioprocesos

Universidad CES

Medellín, 2023

Perfilamiento genómico exhaustivo y su utilidad como factor pronóstico de respuesta en pacientes con gliomas de alto grado a la segunda recaída

Investigador principal
León Darío Ortiz Gómez

Director
Ronald Guillermo Peláez Sánchez PhD

Cotutores
Heidy Johanna Contreras Martínez PhD
David Andrés Galvis Pareja PhD

Escuela de Graduados
Doctorado Ciencias de la Salud

Grupo de investigación
Ciencias farmacéuticas

Línea de investigación
Biotecnología y bioprocesos

Universidad CES
Medellín, 2023

AGRADECIMIENTOS

A mi esposa Clara y mis hijos María Camila y Andrés Felipe por su apoyo y comprensión.

A mi tutor, el Doctor Ronald Guillermo Peláez Sánchez por sus consejos, capacitación y revisiones que me permitieron percibir el gusto que manifestaba con cada uno de los conceptos de Neuro-oncología que le presentaba.

A la Doctora Heidy Johana Contreras Martínez que no solo me apoyo en su experticia, la Epidemiología, sino que reviso también los temas de biología molecular en los gliomas de alto grado.

Al Doctor David Andrés Galvis Pareja, que desde el comienzo me dio ánimos para seguir adelante y estuvo pendiente de revisar mis progresos.

A la Doctora Ángela María Segura Cardona, en quien encontré apoyo humano y administrativo cuando tuve alguna dificultad de esta índole.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
Agradecimientos	3
Tabla de contenido	4
Lista de tablas	7
Lista de figuras	9
Lista de anexos	13
Abreviaturas importantes	14
Resumen	15
Abstract	17
1 Formulación del problema	19
1.1 Planteamiento del problema	19
1.2 Justificación	22
1.3 Pregunta de investigación	25
2 Marco teórico	26
2.1 Gliomas de Alto grado	26
1.1.1 Epidemiología.....	26
2.1.1 Diagnóstico clínico.....	27
2.1.2 Confirmación imagenológica.....	28
2.1.3 Cirugía.....	29
2.1.4 Diagnóstico patológico.....	30
2.1.5 Biología molecular.....	31
2.1.6 Radioterapia.....	33
2.1.7 Quimioterapia.....	35
2.1.8 Progresión y recaída.....	46
2.1.9 Tratamiento en Colombia.....	48
2.2 Secuenciación de nueva generación	49
1.1.2 Tipo de muestra.....	50
2.2.1 Elaboración de la secuenciación.....	53
2.2.2 Análisis de la prueba.....	54
2.2.3 Perfilamiento genómico exhaustivo F1-CDx.....	64
2.2.4 Genes involucrados en la clasificación de los HGG.....	66
2.3 Factor Pronostico	72
2.3.1 Biomarcadores Pronósticos.....	73
2.3.2 Biomarcadores Predictivos.....	74
2.4 Mecanismos de resistencia a la TMZ	75
2.4.1 Alteraciones moleculares en GB resistente a la TMZ.....	76
2.4.2 Mecanismos de quimio-resistencia de las células madre (GSC).....	89
2.4.3 Redes de señalización intracelular involucradas en la resistencia.....	98

2.4.4	RTK y su quimio-resistencia mediada por señalización relacionada	107
3 Hipótesis	125
4 Objetivos	126
4.1	General	126
4.2	Específicos	126
5 Metodología	127
5.1	Enfoque metodológico de la investigación	127
5.2	Tipo de estudio	127
5.3	Población	128
5.4	Criterios de elegibilidad	128
5.5	Diseño muestral	128
5.6	Descripción de las variables	129
5.6.1	Tabla de variables	129
5.7	Técnicas de recolección de la información	131
5.7.1	Fuentes de información	131
5.7.2	Instrumentos de recolección de la información.....	131
5.7.3	Proceso de obtención de la información	131
5.8	Prueba piloto	132
5.9	Control de errores y sesgos	133
5.10	Técnicas de procesamiento y análisis de datos.	134
5.10.1	Caracterizar Socio demográfica y clínicamente los pacientes.	134
5.10.2	Determinar la relación entre la presencia de los genes y segunda recaída.	134
5.10.3	Evaluar los genes identificados que mejor expliquen la segunda recaída.	134
5.10.4	Analizar los genes relacionados con la segunda recaída a partir de bioinformática .	135
6 Consideraciones Éticas	137
7 Resultados	139
7.1	Caracterización socio demográfica y clínica de los pacientes.	139
7.1.1	Características sociodemográficas.....	139
7.1.2	Características clínicas.....	140
7.1.3	Descripción de los resultados de las pruebas genómicas.	147
7.2	Relación entre la presencia de los genes y la segunda recaída.	171
7.3	Genes identificados en el perfilamiento que mejor explican la segunda recaída.	173
7.4	Análisis de los genes relacionados con la segunda recaída a partir de la bioinformática	175
8 Discusión	185
9 Limitaciones	196
10	... Conclusiones	197
11	... Conflicto de interés	199

12 ... Recomendaciones	200
13 ... Referencias bibliográficas	201
14 ... Productos	245
14.1 Artículos publicados relacionados con la tesis	245
14.2 Artículos aceptados pero pendientes de publicar relacionados con la tesis	247
14.3 Artículos sometidos relacionados con la tesis	248
14.4 Artículos para someter relacionados con la tesis	251
14.5 Artículos publicados relacionados con la tesis, no soy primer autor	252
14.6 Poster relacionados con la tesis	253
14.7 Eventos	254
14.8 Premio	255
14.9 Artículos publicados en tiempo del Doctorado, no relacionados con la tesis,	256
15 ... Anexos	257

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Evolución en la clasificación de los gliomas difusos tipo adulto Recuento histórico del análisis que llevo a la actual clasificación de los astrocitomas difusos tipo adulto. La mutación de la IDH define si se trata de un A ^{MUT-IDH/G3-4} o un GB ^{WT-IDH}	32
Tabla 2. Diferentes esquemas de administración de temozolomida. El PS incluye TMZ concomitante con la radioterapia y adyuvante. A la recaída, tratando de evitar el efecto de la MGMT, se puede utilizar TMZm, o sea a dosis bajas y continuas o dosis densas, alternando la TMZ semanal o suministrándolo tres semanas, seguido de una semana de descanso.....	40
Tabla 3. Análisis de F1-CDx	66
Tabla 4. Variables sociodemográficas y clínicas.....	129
Tabla 5. Variables experimentales	130
Tabla 6. Caracterización demográfica de los pacientes. Tabla de variables que permiten la caracterización sociodemográfica en números absolutos, porcentajes, e intervalos de confianza del 95%.....	140
Tabla 7. Consolidado con diagnóstico inicial, basado en H-E, IHQ y FISH. Tabla de los 31 pacientes con el diagnóstico inicial, basado en la OMS-4 ^a edición del 2016, codeleción 1p/19q, IDH y MGMT.....	143
Tabla 8. Pacientes a quienes se les efectúa F1-CDx. La tabla muestra los pacientes su diagnóstico OMS 4 ^a -ed, tipo y muestra utilizada para F1-Dx, mutaciones ya reportadas previamente, mutaciones de significado incierto y cambio en el diagnostico basado en OMS 5 ^a -ed.....	147
Tabla 9. Reclasificación patológica de los pacientes según OMS-5ed, 2021. Se puede observar el cambio del diagnóstico inicial (OMS-4ed, 2016), a la nueva clasificación según OMS-5ed, 2021 y los desenlaces o sea la SLP a la primera y segunda recaída y la OS.....	155
Tabla 10. Consolidado final de diagnóstico inicial y final con desenlaces. Se resaltan los pacientes que cambian: de glioblastoma (OMS-4 ^{ed}) a A ^{MUT-IDH/G3-4} (pacientes 17 y 19), con astrocitoma anaplásico (OMS-4 ^{ed}) que cambian a O ^{MUT-IDH,1p/19q/G3} (paciente 26) y con oligoastrocitoma anaplásico (OMS-4 ^{ed}) que cambia a A ^{MUT-IDH, grado3-4} (paciente 30).	157
Tabla 11. Genes que se encontraron en los pacientes ya antes reportados. Tabla en la que se relacionan genes encontrados en los 31 pacientes, ya antes reportados en gliomas.....	164
Tabla 12. Genes reportados que no se encontraron. Se relacionan genes previamente reportados en gliomas, pero que no se encontraron en la cohorte analizada.....	164
Tabla 13. Genes mutados detectados, de los ya reportados. En la tabla se relacionan los genes ya identificados como conductores o drivers, de los 324 genes analizados en F1-CDx, por tipo de tumor.	165
Tabla 14. Genes ya reportados y detectados por tipo de tumor.	168

Tabla 15. Genes relacionados con la segunda recaída. Se relacionan los genes relacionados con la segunda recaída, luego de PS y dosis metronómicas de temozolomida.	171
Tabla 16. Modelo final: genes relacionados con la segunda recaída. Análisis multivariado para identificar los genes mutados asociados a la segunda recaída, tras el uso de temozolomida según PS y TMZm, en pacientes con HGG.	173
Tabla 17. Mutaciones específicas de los genes que conforman el modelo.	174
Tabla 18. Características de proteínas relacionadas con la segunda recaída. La siguiente tabla muestra los dominios, procesos biológicos, función molecular y componentes celulares de las cuatro proteínas relacionadas con la segunda recaída después de usar temozolomida según el protocolo Stupp y una dosis metronómica en pacientes con gliomas de alto grado.	176
Tabla 19. Interacciones y rutas metabólicas de las proteínas. Identificación de las interacciones proteína-proteína y las vías metabólicas de las proteínas codificadas por los 1 cuatro genes mutados relacionados con la segunda recaída tras el uso de temozolomida según el protocolo Stupp y la 2 administración de dosis metronómicas en pacientes con gliomas de alto grado.	177
Tabla 20. Análisis estructural de los efectos de las mutaciones. Análisis estructural del efecto de las mutaciones en las cuatro proteínas codificadas por genes mutados relacionados con la recaída tras el uso de temozolomida según protocolo Stupp y dosis metronómica en pacientes con gliomas de alto grado. La primera columna muestra el nombre de la proteína y la mutación encontrada. La segunda columna muestra el modelado estructural de la proteína de tipo salvaje. La tercera columna muestra el efecto de las mutaciones en la estructura de la proteína. ...	181
Tabla 21. Enfermedades asociadas a cada uno de los genes mutados. Enfermedades relacionadas con los cuatro genes mutados relacionados con segunda recaída tras el uso de temozolomida según el protocolo de Stupp y la dosis metronómica en pacientes con gliomas de alto grado. La primera columna muestra los nombres de los genes. La segunda columna muestra las enfermedades relacionadas con mutaciones en los genes <i>PIK3C2B</i> , <i>ERBB3</i> , <i>KIT</i> y <i>MLH1</i>	183
Tabla 22. Variables que ingresaron al modelo multivariado.	258
Tabla 23. Modelo 1: variables que ingresaron al modelo, sin RB1 y MDM2.	258
Tabla 24. Modelo 2: variables que ingresaron al modelo, sin KDR.	259
Tabla 25. Modelo 3: variables que ingresaron al modelo, sin ATRX.	259
Tabla 26. Modelo 4: variables que ingresaron al modelo, sin NOTCH.	260
Tabla 27. Modelo 5: variables que ingresaron al modelo, sin CDK4.	260
Tabla 28. Modelo 6: variables que ingresaron al modelo, sin NOCTH3.	261
Tabla 29. Modelo 7: variables que ingresaron al modelo, sin TERT.	261
Tabla 30. Modelo 8: variables que ingresaron al modelo, sin DIS3.	262
Tabla 31. Variables que conforman el modelo final, adicionando IDH1.	263
Tabla 32. Pacientes en los que reevalúa diagnostico patológico.	265

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Metabolismo de la TMZ a su forma activa. La TMZ es estable a pH ácido, el paso mucoso gástrica-sangre es del 100%, en pH básico se hidroliza a MTIC y este en AIC y el ion reactivo metildiazonio que pasa BHE, concentrándose especialmente en medio básico de tumor y se escinde en N_2 y CH_3^+ , alquilante.. 39
- Figura 2.** Protocolo Stupp. El PS consiste en suministrar radioterapia (irradiación focal fraccionada en fracciones diarias de 2 Gy administrada 5 días a la semana durante 6 semanas, para un total de 60 Gy) más TMZ diaria continua desde el primer hasta el último día de radioterapia, seguido de seis ciclos de TMZ adyuvante..... 42
- Figura 3.** Papel de la MGMT, para revertir el efecto de la TMZ. La enzima de reparación metilguanina-O6-metiltransferasa (MGMT) repara el ADN a través de la eliminación directa de un grupo alquilo (CH_3^+) del átomo O^6 de la guanina en el ADN de las células expuestas a agentes alquilante, “robándoselo” a través de un grupo sulfhidrilo (SH), formando el compuesto CH_3-SH metanotiol (114). 45
- Figura 4.** Pureza del tumor. Muestra en la que el patólogo molecular seleccionó una muestra representativa de tumor, calculando la pureza de la muestra en un 40%, siendo el 60% restante tejido vecino normal. 51
- Figura 5.** Tipos de muestra. Ya que la mayoría de los tumores son heterogéneos, es ideal tener varias muestras de un mismo tumor. Se debe analizar también el tejido vecino normal y de ser posible una biopsia líquida. Si la mutación está en las 4 muestras. El tumor viene de la línea germinal, de no ser así, es un tumor somático. Comparando las muestras tumorales y la biopsia líquida, se puede observar la heterogeneidad y como se van seleccionando ciertas mutaciones drivers..... 52
- Figura 6.** Esquema de los pasos requeridos para obtener la biblioteca por NGS. 54
- Figura 7.** Análisis de secuenciación. La cobertura media es el número promedio de lecturas que cubren cada ubicación dentro de su región de interés. En relación con los tipos de variación, puede ser de variación de nucleótidos simples, en el número de copias o rearrreglos..... 56
- Figura 8.** Ejemplo de amplificación. Gráfico típico de CNV de un GB^{WT-IDH} . Ganancia de los cromosomas trisomía 7, 19 y 20. Una amplificación de EGFR y una delección homocigótica de CDKN2A/B. Otras 27 regiones de genes están resaltadas de forma predeterminada con el nombre del gen. 57
- Figura 9.** Variante germinal hereditaria. Variante presente en todas las células del cuerpo, tanto normal como cancerosa. En una variante de línea germinal homocigótica, se observará la mutación en todas las lecturas de secuenciación de la muestra (VAF=1), mientras que en variante de línea germinal heterocigótica se observará en aproximadamente el 50% de las lecturas (VAF=0.5)..... 58
- Figura 10.** Mutación clonal somática. Variante presente solo en las células cancerosas. En una variante homocigótica, la VAF equivaldrá a la pureza del tumor. En una heterocigótica la VAF equivaldría a la mitad de la pureza del tumor. 59

Figura 11. Interpretación de variación. Las variaciones pueden ser benignas, patogénicas o de significado incierto. Un ejemplo de una mutación patogénica en el gen BRAF, en donde cambia una timina por una adenina en la posición 1799, lo que se traduce en una proteína en la que cambia una valina por un ácido glutámico en la posición 600. Al encontrar una mutación de significado incierto o desconocido se debe evaluar si es germinal o somática, si es temprana o tardía, se debe buscar su frecuencia en la población y si esta reportada en cáncer y cuáles serían sus implicaciones. 61

Figura 12. Firmas mutacionales. La TMB es una medida de la densidad de mutaciones codificantes que se encuentran en el genoma de un tumor. Se ha identificado relación entre ciertos factores micro-ambientales y ciertas mutaciones. Una maquinaria de reparación de ajustes competente (MMR-P) tendrá estabilidad microsatelital (MSS), y una deficiente (MMR-D) tendrá altos niveles de inestabilidad de microsatélites (MSI-H). 64

Figura 13. Gliomas de alto grado, según OMS-4^{ed}, 2016. El pilar en su clasificación es la mutación de la IDH en la célula precursora y en la cual, en los LGG, van pasado a glioma anaplásico y GB secundario. Las células precursoras que no tienen la mutación IDH, a medida que se suman otras alteraciones genómicas, van a dar origen a un GB primario. 68

Figura 14. Esquema: células GB/PDX TMZ-R innatas y adquiridas. Las células GB TMZ-R innata tienen diferentes vías de señalización para TMZ en comparación con las células GB TMZ-S. Además de la activación de la vía Wnt/ β -catenina/MGMT, las células GB/PDX innatas TMZ-R tienen activación de la vía EGFR/MAPK/STAT, la vía Akt/mTOR/HIF-1 α y la vía hedgehog/MGMT. Las células GB/PDX con resistencia adquirida a TMZ tienen canales más diversos, como la vía EGFR/JNK/ERK activada, la vía hedgehog, la vía NF-kB, la vía PI3K/Akt, la vía Ras y la vía MAPK/ERK. 89

Figura 15. Citotoxicidad y mecanismos de resistencia. La TMZ da origen a la O⁶-mG, que se aparea a la timina en vez de la citosina y el sistema MMR repara solo la cadena que contiene la timina, dejando intacta la que tiene la guanina metilada, y a medida que se van acumulando llevan a DSB, suspensión del ciclo celular en fase G2M y apoptosis causando citotoxicidad. El otro mecanismo de acción de la TMZ es metilando la guanina en la posición 7 (N⁷-MeG) o la adenina en la posición 3 (N³-MeA), que si son reparadas por los sistemas BER (iniciado por APNG) o PARP1 llevaría a resistencia y sobrevida celular, pero si estos no funcionan adecuadamente, llevaría a SSB y apoptosis. 92

Figura 16. Esquema de puntos de control y reparación del ADN. Los daños en el ADN causados por la TMZ son reparados por proteínas del complejo de control de daños Mre11/Rad50/Nbs1 (MRN), que resintetizan una copia fiel de ADN. Los DSB activan ATM/ATR. 96

Figura 17. Transducción de señales inducidos por TMZ en gliomas, se presenta resistencia a la TMZ por un exceso de MGMT, o por déficit de p53 (que frena MGMT) o alguno de los componentes de MMR. 101

Figura 18. DSB y estrés de replicación en el ADN inducidas por TMZ. Los DSB y el estrés de replicación mediado por TMZ estimulan la activación de DMR. Las DSB activa un proceso que se orquesta a través de una activación secuencial de

varias moléculas que desencadenan dos vías: la vía mediada por la proteína tumoral p53 (ATM-CHK2-p53) y vía ATR-CHK2. Hacen que se presente resistencia a la TMZ el funcionamiento a la baja de p53, CHK2 y p21 ya que no se lograría la detención permanente del ciclo celular. 103

Figura 19. La maquinaria molecular a la muerte celular inducida por TMZ. La activación de p53 provoca la muerte celular a través de una cascada intrínseca dependiente de las mitocondrias y una vía extrínseca mediada por el receptor de muerte. La función a la baja de p53 o al alza de MDM2, XIAP y MGMT lleva a resistencia a la TMZ. 106

Figura 20. La Regulación vías RTK-PI3K-Akt-mTORC1 y RTK-PI3K-mTORC2 Llevan a resistencia a la TMZ la función a la baja de NF-1, p53 y PTEN, que revierte el paso de PIP2 en PIP3 o la función al alza de los RTK: p110a, XIAP, MDM2 o BRAF. 113

Figura 21. Fosforilación de PIP, a través de quinasas específicas. 116

Figura 22. Vía RTK-PI3K-AKT- NFkB-MDR1, que lleva a resistencia. La sobre activación de ciertos RTK como ERBB3 y c-kit o de ciertas enzimas PI3K como PIK3C2B que fomentan el paso de PIP 2 a PIP3, activan la vía AKT-factor de transcripción NFkB que a su vez activa el factor de resistencia a múltiples drogas 1 (MDR1), dentro de ellas, la TMZ. 118

Figura 23. Antecedente de cáncer de los de los pacientes con HGG. 141

Figura 24. Tipo de tumor de los de los pacientes con HGG. En la figura se muestra la clasificación de los 31 pacientes analizados según el tipo de tumor, según OMS-4ed, 2016: glioblastoma (GB), astrocitoma anaplásico (AA), oligoastrocitoma anaplásico (OAA) y oligodendroglioma anaplásico (OA). El tumor más frecuente fue el glioblastoma con un 68%. 142

Figura 25. Ciclos TMZ adyuvante de los participantes con HGG. La figura muestra los ciclos de tratamiento con TMZ adyuvante administrados a los 31 pacientes con glioma de alto grado. 145

Figura 26. Ciclos TMZ metronómica de los participantes. La figura muestra el número de ciclos de tratamiento con temozolomida metronómica que recibieron los pacientes luego de recaer a la PS hasta antes de presentar la segunda recaída. 146

Figura 27. Ciclos de bevacizumab de los participantes. La figura muestra el número de ciclos de tratamiento con bevacizumab que recibieron los pacientes luego de recaer a la PS hasta antes de presentar la segunda recaída. 146

Figura 28. Observaciones clínicas realizadas en el proceso. La figura muestra tipos de tratamiento que recibieron los pacientes, basados en los resultados de F1-CDx, luego de la segunda recaída. 147

Figura 29: Curvas de supervivencia según el método de Kaplan-Meier. Este análisis se realizó para estimar el tiempo que tardan los pacientes con y sin mutaciones en los genes PIK3C2B, KIT, ERBB3 y MLH1 en presentar una segunda recaída después del tratamiento con temozolomida metronómica. El gráfico muestra pacientes sin mutaciones con líneas azules, mientras que las líneas rojas representan pacientes con mutaciones, observándose que los pacientes con mutaciones presentan una segunda recaída antes. El símbolo 0 representa pacientes sin mutaciones y el símbolo 1 representa pacientes con

mutaciones. El eje Y representa la tasa de supervivencia y el eje X muestra el tiempo en meses. 175

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1 Árbol del problema	257
Anexo 2 . Modelo multivariado	258
Anexo 3 . Pacientes en los que cambia el diagnostico patológico.....	264
Anexo 4 . Consentimiento informado.....	268
Anexo 5 . Aval ético.....	271
Anexo 6 . Aval de comité de ética al consentimiento informado	276
Anexo 7 . Comité Ética Instituto de Cancerología	277

ABREVIATURAS IMPORTANTES

AA: astrocitoma anaplásico
APNG: alquilpurina-ADN-N-glicosilasa
BER: reparación por escisión de bases
BEV: bevacizumab
CX: cirugía
DMR: respuesta al daño por TMZ
GB: glioblastoma
GB^{WT-IDH}: glioblastoma según la nueva clasificación 2021
GSC: células madre
HRa: cociente de riesgos instantáneos ajustado
HRc: cociente de riesgos instantáneos no ajustado
KPS: índice funcional de Karnofsky
LCR: líquido cefalorraquídeo
MMR: sistema de reparación de daños
OA: oligodendroglioma anaplásico
OAA: oligoastrocitoma anaplásico
O^{MUT-IDH,1p/19q/G3}: Oligodendroglioma (equivale al oligodendroglioma anaplásico)
OS: supervivencia global
PARP1: poli [ADP-ribosa] polimerasa 1
QT: quimioterapia
RT: radioterapia
SLP: supervivencia libre de progresión
NGS: Next Generation Sequencing
SNC: sistema nervioso central
SNV: variación de nucleótido simple
TMZ: temozolomida
TMZ-R: con resistencia adquirida
TMZ-S: sensibles a TMZ
VAF: frecuencia de variante del alelo
Indels: inserciones y deleciones
VCN: variación en el número de copias
OMS-4^{ed}: edición del 2016 de la Organización Mundial de la Salud
OMS-5^{ed}: edición del 2021 de la Organización mundial de la Salud
A^{MUT-IDH/G3-4}: astrocitoma (equivale al astrocitoma anaplásico)
O⁶G: metilación en la posición O6 de la guanina

RESUMEN

El tratamiento en los pacientes con gliomas de alto grado incluye radioterapia y temozolomida (protocolo Stupp). La temozolomida metila las guaninas del ADN, lo cual conlleva a errores de apareamiento entre la guanina y la citosina, cambiándose esta última por timina, activando el sistema de reparación de errores de emparejamiento del ADN denominado MMR, el cual repara solo la cadena con la timina, dejando intacta la que tiene la guanina metilada. Estos errores generan apoptosis celular en las células cancerígenas. No obstante, algunos pacientes no responden a la temozolomida, ya que tienen un mecanismo de reversión de la metilación mediante la enzima O⁶-metilguanina-ADN-metiltransferasa.

La transcripción del gen que codifica para la proteína está regulada por la metilación de su promotor. Los promotores metilados bloquean la producción de la enzima, mientras los no metilados favorecen su transcripción. Se ha tratado de utilizar este biomarcador como un factor predictor de respuesta del tratamiento. Sin embargo, al relacionarlo con el tratamiento, si bien en los pacientes en que tienen metilado el promotor disminuye el riesgo de muerte en el 49%, en los que no lo tienen metilado también disminuye el riesgo de muerte en un 31%, lo cual sugiere la existencia de otros genes involucrados en la resistencia a la temozolomida y otros mecanismos de acción del medicamento.

Objetivos: evaluar los genes mutados asociados con cáncer y su utilidad como factor pronóstico de respuesta en pacientes con glioma de alto grado a la segunda recaída.

Metodología: es un estudio **observacional ambispectivo de cohorte**, donde **la ocurrencia del evento se registró durante el seguimiento**. Se pretendió dar respuesta al principio de plausibilidad biológica a través de la explicación de que la presencia de mutación en los genes de las personas con diagnóstico de glioma de alto grado antecede la aparición de la segunda recaída en la cohorte en estudio; esto controlado por variables confusoras y de interacción. Se captó un grupo de 31 pacientes con gliomas de alto grado, a los cuales se les realizó la caracterización clínica, imagenológica y patológica. Se realizó el secuenciamiento de 324 genes relacionados con diferentes tipos de cáncer y posteriormente se realizó un análisis estadístico para determinar los genes que más se relacionaban con la resistencia al tratamiento. Finalmente, se realizó un análisis bioinformático para determinar el efecto de las mutaciones en los genes e identificar las rutas metabólicas afectadas en estos pacientes.

Resultados: fueron incluidos en la investigación 31 pacientes con gliomas de alto grado, a los cuales se les realizó secuenciación de 324 genes asociados a diferentes tipos de cáncer, encontrándose **185 genes con 322 mutaciones diferentes (130 drivers y 192 de significado incierto)**, lo que permitió **reevaluar el diagnóstico histológico en 4 pacientes** y definir que los genes relacionados con la segunda recaída de los pacientes con glioma de alto grado, luego del uso de temozolomida en el protocolo Stupp y metronómica, fueron *PIK3C2B* con un **HR ajustado 82,37 (IC95% 8,36-811,67, p=0,000)**, *KIT* con un **HR 10,24 (IC95% 2,42-43,34, p=0,002)**, *ERBB3* con un **HR 13,20 (IC95% 2,77-62,77, p=0,001)** y *MLH1* con un **HR 8,50 (IC95% 1,83-39,45, p=0,006)**. Adicionalmente se encontró que con estas mutaciones posiblemente se altera la vía metabólica **RTK-PI3K-AKT-mTOR** y el sistema de reparación MMR.

Conclusiones: teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se puede sugerir la búsqueda de mutación en los *PIK3C2B*, *ERBB3*, *KIT* y *MLH1*, que en conjunto con la información suministrada sobre la metilación del promotor del gen que codifica para la enzima O⁶-metilguanina-ADN-metiltransferasa, puede ayudar a tener argumentos más precisos para el pronóstico de los pacientes con gliomas de alto grado que son tratados con temozolomida. El análisis bioinformático, permitió caracterizar la mutación y analizar el impacto en las vías relacionadas con cáncer, confirmando los resultados obtenidos a partir de la aplicación de pruebas estadísticas.

Palabras clave: glioma, temozolomida, fracaso del tratamiento, análisis de secuencia, mutación (Mesh)

ABSTRACT

Treatment in patients with high-grade gliomas includes radiotherapy and temozolomide (Stupp protocol). Temozolomide methylates DNA guanines, which leads to mismatches between guanine and cytosine, changing the latter to thymine, activating the DNA mismatch repair system called MMR, which repairs only the strand with the thymine, leaving intact the one with the methylated guanine. These errors generate cell apoptosis in cancer cells. However, some patients do not respond to temozolomide since they have a methylation reversal mechanism through the enzyme O6-methylguanine-DNA-methyltransferase.

The transcription of the gene that codes for the protein is regulated by the methylation of its promoter. The methylated promoters block the production of the enzyme, while the unmethylated ones favor its transcription. Attempts have been made to use this biomarker as a predictor of treatment response. However, when relating it to treatment, although in patients with methylation of the promoter the risk of death decreases by 49%, in those without methylation the risk of death also decreases by 31%, which suggests the existence of other genes involved in resistance to temozolomide and other mechanisms of drug action.

Objectives: to evaluate mutated genes associated with cancer and their usefulness as a prognostic factor for response in patients with high-grade glioma to second relapse.

Methodology: it is an observational, cohort, ambispective study, where the occurrence of the event was recorded during follow-up. It was intended to respond to the principle of biological plausibility by explaining that the presence of a mutation in the genes of people diagnosed with high-grade glioma precedes the appearance of the second relapse in the study cohort; this controlled for confounding and interaction variables. A group of 31 patients with high-grade gliomas was recruited, who underwent clinical, imaging, and pathological characterization. The sequencing of 324 genes related to different types of cancer was carried out and later a statistical analysis was carried out to determine the genes that were most related to resistance to treatment. Finally, a bioinformatic analysis was performed to determine the effect of the mutations in the genes and to identify the metabolic pathways affected in these patients.

Results: 31 patients with high-grade gliomas were included in the research, who underwent sequencing of 324 genes associated with different types of cancer, finding that there were 185 mutated genes with 322 different mutations (130 drivers

and 192 of uncertain significance).), which allowed us to re-evaluate the histological diagnosis in 4 patients and define that the genes related to the second relapse of patients with high-grade glioma, after the use of temozolomide in the Stupp and metronomic protocol, were PIK3C2B with an adjusted HR 82.37 (95% CI 8.36-811.67, p=0.000), KIT with HR 10.24 (95% CI 2.42-43.34, p=0.002), ERBB3 with HR 13.20 (95% CI 2.77-62.77, p =0.001) and MLH1 with a HR 8.50 (95% CI 1.83-39.45, p=0.006). Furthermore, it was found that with these mutations, the RTK-PI3K-AKT-mTOR metabolic pathway and the MMR repair system are possibly altered.

Conclusions: considering the results obtained, the search for mutations in PIK3C2B, ERBB3, KIT and MLH1, which together with the information provided on the methylation of the promoter of the gene that encodes the enzyme O6-methylguanine-DNA-methyltransferase, can help to have more precise arguments for the prognosis of patients with high-grade gliomas who are treated with temozolomide. The bioinformatics analysis allowed characterizing the mutation and analyzing the impact on cancer-related pathways, confirming the results obtained from the application of statistical tests.

Keywords: glioma, temozolomide, treatment failure, sequence analysis, mutation. (Mesh)

1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

1.1 Planteamiento del problema

Según el Registro Central de los Tumores del Sistema Nervioso Central de los Estados Unidos (CBTRUS) la tasa de incidencia anual registrada entre el 2014 y el 2018 para los tumores primarios del sistema nervioso central (SNC) fue de 24 por 100.000 habitantes (1). De esta corresponde 7 por 100.000 a los tumores malignos, siendo la mitad de ellos gliomas de alto grado (HGG) (1) y que según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de los tumores del SNC 4ª edición del 2016 (OMS-4^{ed}) serían el glioblastoma multiforme (GB), el astrocitoma anaplásico (AA), el oligodendroglioma anaplásico (OA) y el oligoastrocitoma anaplásico (2), que proyectado para Colombia, serían unos 3.500 nuevos casos al año (3).

En el 2021 se publicó la 5ª edición de clasificación de tumores del SNC de la OMS (OMS-5^{ed}) y en ella corresponderían a los HGG los ahora denominados familia de los gliomas difusos del adulto compuesta por el GB no mutado, silvestre o “wild-type” para IDH (GB^{WT-IDH} por su sigla en inglés), el astrocitoma mutado para IDH grados 3 y 4 ($A^{MUT-IDH/G3-4}$) y el oligodendroglioma mutado para IDH, con codeleción 1p/19q, grado 3 ($O^{MUT-IDH,1p/19q/G3}$) (4).

En el GB^{WT-IDH} , que es el más frecuente y agresivo, se ha estandarizado su manejo, que consiste en una resección quirúrgica lo más amplia posible, seguida de un protocolo denominado Stupp (PS), que consiste en radioterapia (RT) y quimioterapia (QT) con temozolomida (TMZ) concomitante, seguida de TMZ adyuvante (5). El PS se estandarizó a partir de la evidencia reportada en un estudio que incluyó 573 pacientes y en el que se reportó luego de una mediana de seguimiento de 28 meses, una mediana de supervivencia global de 14,6 meses con RT más TMZ y de 12,1 meses con RT sola (5). En este estudio se encontró un cociente de riesgos instantáneos no ajustado (HR) para la muerte en el grupo de RT más TMZ de 0,63 (IC95% 0,52 a 0,75; $P < 0,001$). La tasa de supervivencia a dos años fue del 26,5% con RT más TMZ y del 10,4% con solo RT. El tratamiento concomitante con RT más TMZ resultó en efectos tóxicos hematológicos de grado 3 o 4 en el 7% de los pacientes (5).

Actualmente es posible detectar la metilación del promotor del gen que traduce la enzima O⁶-metilguanina-ADN-metiltransferasa (MGMT) en cuyo caso no se produciría la enzima que revierte el efecto de la TMZ, lo cual se esperaba se tradujera en una respuesta óptima (6), pero un estudio mostro que esta respuesta

puede variar cuando el análisis de la metilación se realiza a través de reacción en cadena de polimerasa (PCR) ya que en los que tienen metilado el promotor solo disminuye el riesgo de muerte en un 49% (HR 0,51; IC95% 0,31-0,84) y en los que no tienen metilado el promotor, que tienen la enzima MGMT, disminuye el riesgo de muerte en un 31% (HR 0,69; IC95% 0,47-1,02) (7).

Se analizó la edad como factor pronóstico con un HR: 1,01(95%IC 0,99-1,02, P=0,47) y predictor con un HR: 0,36 (95%IC 0,99-1,03 P=0,36. El estado cognitivo a través del minimental con un HR pronóstico de 0,94 (95%IC 0,89-0,98, P=0,007) y predictor con un HR 0,93 (95%IC 0,89-0,98, p=0,04). El uso de corticosteroides al iniciar la PS o la RT con un HR pronóstico de 1,41 (95%IC 0,97-2,04) y predictor HR 1,39 (95%IC 0,96-2,00). El recibir TMZ más RT (versus RT) no pudiéndose encontrar el HR pronóstica y el predictor fue 0,68 (95%IC 0,45-1,02, P=0,06). La metilación del promotor (versus no metilación) con un HR pronóstico <0,41 (95%IC 0,29-0,57) y un HR predictor 0,49 (95%IC 0,32-0,76) p=0,001. La metilación del promotor de la MGMT y PS (versus no metilación o RT) no pudiéndose encontrar el HR pronóstica y un HR predictor de 0,71 (95%IC 0,37-1,35, p=0,29) (7).

También se ha demostrado el valor pronóstico de la codeleción 1p/19q por FISH (8) y de la mutación de la IDH por IHQ (9). Se ha analizado la importancia de tener mutaciones *BRAF*, alteraciones en el promotor de *TERT* y la expresión de Ki67 y p53 (10) encontrándose que estas dos últimas pueden tener valor pronóstico (10). También se ha documentado la importancia de una adecuada resección quirúrgica (11).

Basado en ello, al tener la entrevista con un paciente con un HGG y su familia, se les puede explicar la importancia pronóstica del estado cognitivo ya que si se encuentra que el paciente no tiene deterioro cognitivo (minimental entre 27 y 30 puntos), tendrá un mejor pronóstico, pero este va a variar a medida que desciende el puntaje. Si en el informe de patología se reporta que el tumor tiene la codeleción 1p/19q y la mutación de la IDH (o sea que es un $O^{MUT-IDH,1p/19q/G3}$), va a tener una evolución más favorable que quien tiene solo la mutación de la IDH (que tendría un $A^{MUT-IDH/G3-4}$) y este a su vez, mejor pronóstico que el que quien no tiene la mutación de la IDH (que lo caracterizaría como un GB^{WT-IDH}). Que con un bajo Ki67 y una baja expresión de p56 el pronóstico es mejor y que si tiene metilado el promotor de la MGMT, va a tener una evolución más favorable, independientemente si recibe PS o solo RT.

Al no tenerse un biomarcador predictor de respuesta, a todos los pacientes adultos menores de 70 años y con un estado funcional dado por la escala de Karnofsky

(KPS) mayor de 70, independientemente de la necesidad de corticosteroides, se les ofrece el PS. En los únicos pacientes en los que la metilación del promotor de la MGMT tendría valor predictivo de respuesta, es en los pacientes mayores de 70 años, con un adecuado KPS, en los que, con el fin de evitar toxicidad, si tienen metilado el promotor de la MGMT se prefiere TMZ y en los que no lo tienen metilado RT.

Se esta entonces ofreciendo la alternativa de suministrar TMZ concomitante y adyuvante a todos los pacientes, a sabiendas de que no a todos les va a servir y bien la TMZ no tiene toxicidad acumulativa y es bien tolerado, no deja de tener toxicidad hematológica idiosincrásica y molestias como disminución transitoria de los elementos formes de la sangre, constipación y a veces dolor abdominal tipo cólico.

Se debe tener en cuenta entonces que la respuesta a la TMZ es variable, ya que puede darse resistencia intrínseca o fallo a la terapia por resistencia adquirida pocos meses después de iniciada (12). Por esta razón fue necesario evaluar los genes mutados asociados con cáncer y su utilidad como factor pronóstico de respuesta en pacientes con glioma de alto grado a la segunda recaída, por medio del análisis de biología molecular que permitió profundizar en los mecanismos de resistencia a la TMZ para encontrar marcadores biológicos que aportaran argumentos pronósticos (13).

1.2 Justificación

Para el 2018 en Estados Unidos, los tumores del SNC representaron aproximadamente un 1,4% de los nuevos diagnósticos de cáncer y causaron el 2,6% de las muertes por esta enfermedad (14). En Colombia no se tiene registro de la incidencia de los HGG. Un estudio observacional retrospectivo y descriptivo, tomo las bases de datos de registros de cáncer de base poblacional para el periodo 2003-2012, sin restricción de grupo etario encontrando reportados 775 pacientes adultos y 123 niños con diagnóstico nuevo de tumor del SNC. Los más frecuentes en la edad pediátrica fueron los neuroepiteliales seguidos de los embrionarios y los ependimarios, y para los adultos fueron los tumores neuroepiteliales, los meningiomas y los hematolinfoides. La sobrevida global a seis meses, un año, dos años y tres años, en la población pediátrica fue de 49,9 %, 35,2 %, 21,4 % y 15,3 %, respectivamente; para los adultos fue del 70,2 %, 58,9 %, 43,3 % y 35,4 % (3).

Inicialmente los pacientes con HGG se trataban solo con cirugía (CX). Posteriormente se adiciono la RT. El manejo medico oncológico complementario a la CX y la RT ha tenido un abordaje terapéutico que ha variado acorde a la disponibilidad de nuevas moléculas a través del tiempo. En la década de los 90 se usaron alquilantes tipo nitrosoureas de primera generación como el carmustine (BCNU) y el lomustine (CCNU) hasta la década del 2000 que estuvo disponible el alquilante de segunda generación, de la familia de los triazenos la TMZ. El uso la TMZ como parte de la PS se estandarizo en el mundo a partir de la publicación del Dr. Stupp en el 2005, en el que se reportó un aumento en la mediana de sobrevida a 14,6 meses con la PS vs. 12,1 meses con solo RT, (5). lo cual se ha corroborado por otros (15) y con similares resultados reportados en Colombia (16). A la recaída se utilizan varios esquemas, dentro de ellos la temozolomida a dosis metronómicas (TMZm) (17).

Teniendo en cuenta que hay un porcentaje de la población que no responde adecuadamente a la PS, se han buscado biomarcadores que permitan identificar la causa de no respuesta como sería la no metilación del promotor del gen *MGMT* que permite la transcripción de la enzima MGMT, la cual revierte el efecto de la TMZ en la célula tumoral. Este biomarcador no es lo suficientemente sensible ni específico ya que se encontró solo una diferencia de aproximadamente el 18% de riesgo de muerte entre los pacientes que tenían el promotor metilado (HR: 0,51 IC95% 0,31-0,84) y no metilado (HR: 0,69 IC95% 0,47-1,02), por lo que independiente de esta, todos los pacientes adultos menores de 70 años con HGG, reciben el PS.

Es importante buscar otros biomarcadores (18–20), pronósticos y que permitan explicar con mayor certeza a los pacientes y sus familias el problema y seleccionar los candidatos ideales para el uso de TMZ y una forma de encontrarlos es buscar las alteraciones genómicas implicadas en la resistencia innata ya que más o menos la mitad de los pacientes que reciben la PS progresan a pesar de este y adquirida ya que el 60% de la mitad de los que inicialmente responden, recaen a los pocos meses, debido posiblemente una nueva producción de MGMT dependiente de la desmetilación del promotor, nuevos ARN no codificantes, modificación en la metilación de las histonas y otras alteraciones genómicas (21).

El advenimiento de la secuenciación de nueva generación (NGS), ha permitido profundizar en la biología molecular del cáncer, especialmente en los HGG que por su complejidad y cortos desenlaces ha servido como punta de lanza para este análisis (22). En Colombia se habían tipificado, entre otras, desde el punto de vista genómico hispanos con gliomas de bajo grado (LGG) (23). Al expandirse el acceso de la prueba NGS y la genómica computacional se han encontrado un número importante de nuevas mutaciones y alteraciones epigenéticas que permiten reclasificar los pacientes, buscar nuevos biomarcadores y optimizar el uso de medicamentos existentes o la implementación de nuevas terapias denominadas blanco dirigidas, favoreciendo la individualización del tratamiento (22).

Actualmente se cuenta con varias plataformas de NGS que albergan una gran cantidad de genes, entre ellas quizá la más completa es la de FoundationONE CDx (F1-CDx) que analiza 324 genes relacionados con cáncer. Esta tecnología adquiere relevancia ya que no solo permite reclasificar los pacientes previamente informados en base a la hematoxilina-eosina (H-E) (24), inmunohistoquímica (IHQ) y otros análisis previos a la NGS (25,26), sino encontrar los genes relacionados con la resistencia al uso de TMZ, para lo cual se utilizará F1-CDx, en pacientes que han recibido TMZ, de lo cual no hay reportes a la fecha (27).

En esta investigación se efectuó un perfilamiento genómico exhaustivo a la segunda recaída en pacientes con HGG, luego del uso del PS y de TMZm, identificando los genes que estaban relacionados con una mayor probabilidad de resistencia a la TMZ, teniendo como fuente fundamental la información genética aportada por la plataforma NGS; estas mutaciones se pueden asociar al análisis del promotor de la MGMT para tener una mayor certeza pronóstica en los pacientes con glioma de alto grado.

1.3 *Pregunta de investigación*

¿Cuáles son los genes mutados asociados con cáncer que tienen un valor pronóstico en pacientes con gliomas de alto grado a la segunda recaída?

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Gliomas de Alto grado

En la OMS-5^{ed} del 2021(24) se modifica la clasificación de los HGG omitiendo el termino oligoastrocitoma y definiéndose la familia de los gliomas difusos infiltrantes del adulto, que queda conformada por el GB^{WT-IDH}, en el que se pueden encontrar en porcentajes variables mutación del gen del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*), mutación del promotor del gen de la telomerasa de la transcriptasa inversa (*pTERT*), la trisomía del cromosoma 7 y monosomía del 10, con una mediana de sobrevida de 14,6 meses (5); el A^{MUT-IDH/G2-4} en el que se pueden encontrar mutación del gen de la alfa-talasemia con retraso mental ligado al cromosoma X (*ATRX*), de la proteína tumoral supresora TP53 (*TP53*) y del gen inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina 2A (*CDKN2A/B*), con mediana de sobrevida de unos 4 años (28); y el O^{MUT-IDH,1p/19q/G2-3} en el que se pueden estar mutado el promotor de *TERT*, la mutación del gen capicúa que da origen a una proteína represora transcripcional (*CIC*), el gen que da origen a la proteína 1 de unión al elemento *upstream* Far (*FUBP1*), el gen que transcribe la proteína 1 homologa de muesca del locus neurogénico (*NOTCH1*) y codelección del brazo corto del cromosoma 1 y del brazo largo del cromosoma 19 (1p/19q), con mediana de sobrevida de unos 7 años (29).

1.1.1 Epidemiología

La incidencia y prevalencia de los tumores del SNC está documentada de manera imprecisa porque hasta el 2003 no era necesario informar los tumores benignos y la enfermedad metastásica en el cerebro sigue sin informarse adecuadamente (30). Las principales fuentes de datos para los Estados Unidos incluyen el SEER (programa de Vigilancia, Epidemiología y Resultados Finales) y el CBTRUS cuya base de datos es el más grande registro poblacional, centrándose en los tumores del SNC. La tasa de incidencia media anual ajustada por edad, utilizando la población estándar de EE. UU de 2000 (AAAIR) de todos los tumores del SNC malignos y no malignos fue de 24,71 por 100.000 habitantes (AAAIR maligno = 7,02 y AAAIR no maligno = 17,69). Esta tasa general fue mayor en el sexo femenino (27,62 frente a 21,60 por 100.000) y en las personas no hispanas en comparación con las hispanas (25,09 frente a 22,95 por 100.000) (31).

En relación con la incidencia, la histopatología maligna del encéfalo más frecuente fue el GB (14,2 % de todos los tumores y el 50,1 % de todos los tumores

malignos), y la histopatología no maligna más frecuente fue el meningioma (39,7 % de todos los tumores y 55,4 % de todos los tumores no malignos). El GB fue más común en los hombres y los meningiomas fueron más comunes en las mujeres. En niños y adolescentes (de 0 a 19 años), la tasa de incidencia de todos los tumores del SNC primarios fue de 6,20 por 100.000 habitantes. Se espera que se diagnostiquen aproximadamente 93.470 casos nuevos de tumores del SNC malignos y no malignos en la población de EEUU en 2022 (26.670 malignos y 66.806 no malignos) (14).

En cuanto a la mortalidad, hubo 84.264 muertes atribuidas a tumores del SNC malignos entre 2015 y 2019. Esto representa una tasa de mortalidad anual promedio de 4,41 por 100.000 habitantes y un promedio de 16.853 muertes por año. La tasa de supervivencia relativa a cinco años después del diagnóstico de un tumor maligno del SNC fue del 35,7 %, mientras que para los tumores no malignos del SNC la tasa de supervivencia relativa a cinco años fue del 91,8 % (32).

En Colombia, la incidencia reportada para el 2017 en seis ciudades, osciló entre 2,6 y 4,5 por 100.000 habitantes y la mortalidad, entre 0,4 y 5,2 por 100.000 habitantes (3). En otro estudio en Colombia, bidireccional, con 171 pacientes con HGG tratados con el PS, se reportó que la edad promedio era de 56 años (17-84 años), 97 pacientes eran hombres (56%), 82% tenían GB y de estos el 62% fueron GB primarios (16).

2.1.1 Diagnóstico clínico

En los pacientes con tumores cerebrales, las manifestaciones clínicas de los pacientes varían, en algunos pacientes se pueden tener una evolución rápida de los síntomas, usualmente indica un mayor grado de malignidad y por el contrario, una evolución larga está asociada a tumores menos agresivos (33).

La presentación de esta sintomatología se puede separar en dos grupos: aquellos ocasionados por un aumento de la presión intracraneana (HTE) como la cefalea y aquellos que dependen de la localización del tumor (focalización); es de anotar que hay síntomas que pueden ser ocasionados por cualquiera de los dos mecanismos como las crisis convulsivas, que se presentan en el 65% de los pacientes, siendo luego de la cefalea, la segunda presentación clínica más frecuente en el momento del diagnóstico (34), especialmente en los pacientes con O^{MUT-IDH,1p/19q/G2-3} (35).

Dentro del primer grupo, o sea aquellos causados por HTE, se encuentran la cefalea que es el síntoma inicial y más común ya que se presenta en más del 50% de todos los pacientes y se caracteriza por ser global, aumentar con las maniobras de valsalva y despertar el paciente en las horas de la madrugada (36). Otros síntomas son las obscuraciones o sea la pérdida súbita y momentánea de la visión que no necesariamente está asociada a papiledema (37), pérdida progresiva del campo visual ya que este cada vez se va haciendo más tubular (38), vómito brusco y no precedido de náuseas (en proyectil), rigidez de la nuca (aun sin tener meningitis) y desviación lateral de la cabeza. A medida que la HTE aumenta, se puede observar papiledema y en un 40% pueden tener alteración en el nivel de conciencia (39).

El otro tipo de síntomas, son los causados por la localización del tumor y se producen por la irritación o destrucción del parénquima cerebral. Estos síntomas son producto del área afectada. Alteraciones afectivo-comportamentales por lesiones del lóbulo frontal, déficits neurológicos de tipo motor o sensitivo si el paciente tiene el tumor en el lóbulo parietal contralateral; alteraciones visuales generalmente por lesiones en lóbulo occipital; alteraciones de la memoria o el lenguaje en lóbulos temporales, alteración del equilibrio por lesiones en fosa posterior y compromiso de pares y vías por lesiones de tallo cerebral, entre otros (40).

2.1.2 Confirmación imagenológica

El diagnóstico clínico se corrobora con imágenes. En los servicios de urgencias, generalmente se tiene acceso a la tomografía axial computarizada (TAC) que usualmente permite la detección inicial de la lesión y tiene utilidad en el postoperatorio inmediato para descartar sangrado (41). En los centros que no se cuenta con resonancia magnética cerebral (MRI) y se decida intervenir sin esta, la TAC preoperatoria debe ser con medio de contraste yodado (42). Este mismo examen tienen utilidad en el posoperatorio inmediato (primeras 72 horas) para descartar sangrado y tener una idea del porcentaje resección quirúrgica (41).

El complemento ideal a la TAC inicial es la resonancia magnética cerebral (RM) contrastada de ser posible con técnicas avanzadas, esto es perfusión, difusión y en ocasiones espectroscopia. Los gliomas difusos del adulto son hipointensos en T1, hiperintensos en T2, y el coeficiente de difusión aparente (ADC) lo delimita, debido a la alta celularidad (43). Los astrocitomas difusos tipo adulto más

agresivos como el GB^{WT-IDH}, el A^{MUT-IDH/G3-4} y el O^{MUT-IDH,1p/19q/G3}, generalmente captan el contraste y los GB^{WT-IDH} generalmente tienen un área necrótica central (44).

El manejo quirúrgico de los gliomas va a depender de la edad del paciente, el estado funcional dado por la escala de Karnofsky (KPS), comorbilidades y localización del tumor, entre otros. En los HGG una de las mayores dificultades en su enfoque, lo representa la heterogeneidad dentro del lecho tumoral, usualmente con partes de bajo y partes de alto grado, por lo que si no hay una correlación entre la patología y la imagen, la conducta se define en junta interdisciplinaria de Neuro-oncología (45).

En la espectroscopia en gliomas usualmente se observa un pico de colina (Cho) que indica viabilidad tumoral, no se tendrá pico de n-acetil-aspartato (NAA), ya que este existe solo en las neuronas, y en algunos GB con necrosis se observara pico de lactato y mioinositol, que serán más evidentes si existe radionecrosis (46). La espectroscopia puede ayudar a diferenciar gliomas de bajo y al grado y si se detecta un pico de 2 α ketoglutarato (2 α KG) , se puede inferir que la lesión esta mutada para IDH (44).

En ciertos casos y como soporte al neurocirujano se utilizan la MRI funcional y la tractografía. Como complemento a la espectroscopia o en los casos en que esta no tendría utilidad ya que el sitio no es propicio o puede existir contaminación por fluidos vecinos, se puede diferenciar tumor de radionecrosis mediante el estudio de medicina nuclear O-(2-[¹⁸F]fluoroethyl)-L-tyrosine-(FET) (FET-PET-Scan) con aminoácidos como la tirosina y la metionina (47).

2.1.3 Cirugía

Para el manejo quirúrgico es conveniente el uso de técnicas que permitan precisar al máximo tanto el tamaño como la localización del tumor. Avances como la biopsia estereotáxica que se basa en un sistema de localización del tumor con fiducias mediante un sistema geométrico para localizar el punto más adecuado para la biopsia; los sistemas de navegación, que son instrumentos informáticos que fusionan las imágenes radiológicas durante la intervención; el aspirador ultrasónico (CUSA); el uso de la microscopía para microcirugía o con filtros especiales para la utilización de la fluorescencia intraoperatoria usando 5-ALA (delta-aminolevulínico) que es un contraste fluorescente que es metabolizado por

el tejido cerebral y que tiñe de forma diferente el tejido sano y el tumoral, son algunas de las técnicas usadas en la actualidad (48).

Se pretende con la CX es resecar la mayor cantidad posible de lesión tumoral y obtener una muestra representativa para el diagnóstico histológico. Si el KPS y la localización del tumor permiten una resección macroscópica amplia, generalmente se obtiene reducción HTE, lo que permite una mejor acción de los tratamientos posteriores como son la RT y QT (49).

Como se anotó anteriormente, se ha demostrado que a mayor resección del tumor aumenta significativamente la supervivencia, comparada con resecciones menores (50). Lacroix y cols. compararon resecciones del 98% con resecciones menores observando, una supervivencia de 8.8 meses en resecciones menores al 98% y de 13 meses en resecciones de más del 98%, o más. Esta mejoría al tratamiento está sustentada por estudios en el que se analizaron los cambios imagenológicos que se produjeron en el parénquima cerebral tras la resección (51). Se observaron cambios en el metabolismo y en el flujo sanguíneo, así como una apertura de la barrera hematoencefálica (BHE) que podría permitir una mejor penetración de los agentes quimioterapéuticos, siendo una ventaja para incrementar la eficacia del tratamiento al que se someten los pacientes tras la CX (52).

La reintervención quirúrgica es un procedimiento frecuente, debido a la presencia de recidiva o progresión de los HGG. Son candidatos a reintervención los pacientes con un buen estado funcional, con lesiones de fácil acceso, en los que se puede resecar gran volumen tumoral y en quienes se quiere profundizar en la patología. La importancia de la reintervención ha sido sugerida en un análisis realizado en 168 pacientes con GB recurrente donde los pacientes reintervenidos tuvieron una supervivencia del 71% versus el 15% en los sin reintervención a un año y a los dos años (32% Vs 5%) (53).

2.1.4 Diagnóstico patológico

Antes de iniciar un tratamiento con RT y/o QT de una lesión tumoral intracraneal lo ideal es realizar un estudio histológico del tumor (las únicas excepciones en las que se inicia en ocasiones tratamiento sin CX, serían el glioma en alas de mariposa y algunos gliomas de tallo cerebral) ya que las técnicas imagenológicas no pueden establecer un diagnóstico concluyente (54). El material resecado se fija en formol, se monta en bloques de parafina y parte de este, se corta en finas láminas y se fija en placas histológicas que se analizan con coloración de H-E.

Si solo se observa proliferación celular de la glía o “goma” según Ramón y Cajal (55), antes designadas como gliomas de bajo grado (LGG) (56) y que en la clasificación OMS-5^{ed} 2021 pertenecerían a la familia de los gliomas difusos infiltrantes el oligodendroglioma grado 2, ahora denominado $O^{MUT-IDH,1p/19q/G3}$ y que se caracteriza por tener células en forma de “huevo frito”, calcificaciones y una trama vascular delgada y abundante y el astrocitoma grado 2, fibrilar o protoplasmático que corresponde al $A^{MUT-IDH/G2}$ con células en forma de “estrella” (57).

Si en la muestra de patología se observa también proliferación vascular, la OMS-4^{ed} los clasificó como grado III, con la denominación OA y AA y que corresponderían en la OMS-5^{ed} al $O^{MUT-IDH,1p/19q/G3}$ y al $A^{MUT-IDH/G3-4}$. Si además hay necrosis y pseudo-empalizadas este astrocitoma se reportaba antes como grado IV o GB que podría ser primario si era silvestre para IDH (80%) y secundario si era mutado para IDH (20%), términos que en la OMS-5^{ed} se omiten y ahora ambos se denominan GB^{WT-IDH} . Estos últimos (OA, AA y GB) son los que se conocían como HGG. Es de anotar que en la 5^a clasificación se omite el término oligoastrocitoma que correspondía al tumor conformado por oligodendrocitos y astrocitos (24).

La H-E usualmente se complementa con IHQ, técnica en la que se utilizan anticuerpos dirigidos a proteínas específicas como la proteína olig2 y la fibrilar ácida glial (PFAG) para así asegurar la estirpe glial. Esta ayuda diagnóstica también puede detectar las proteínas alteradas debidas a mutaciones genéticas que permiten confirmar y subclasificar los gliomas como *IDH*, *pTER*, *CIC*, *FUBP1*, *NOTCH1*, *ATRX*, *TP53* y *CDKN2A/B* y *EGFR* (24). También se puede buscar por este método la expresión de la MGMT que como se ha comentado tiene valor pronóstico y predictor de respuesta independiente del tratamiento con solo RT o PS (58).

Cuando los hallazgos de H-E e IHQ sugieren un $O^{MUT-IDH,1p/19q/G2-3}$ se puede utilizar la hibridación fluorescente in situ (FISH) para detectar la codelección 1p/19q, lo cual también se puede hacer por NGS (59) en caso de que los hallazgos sugieran un GB^{WT-IDH} , e puede documentar la variación en el número de copias (CNV) +7/-10 por cariotipo, FISH o NGS (24).

2.1.5 Biología molecular

Desde el 2001 se comenzaron a hacer algunos esbozos de la clasificación de los tumores del SNC basados en los perfiles de expresión genética. En el 2003 se completó la secuencia del genoma humano y en el 2005 nace el proyecto de genoma humano en cáncer. Basado en ello, Phillips en el 2008, a partir del perfil de expresión divide los HGG en proliferativo, proneural y mesenquimal. En el 2010 Verhaak con base en la transcriptómica, los divide en clásico, mesenquimal, proneural y neural. En el 2013 se hace una clasificación basada en el metiloma y Brennan introduce 6 grupos, en donde el M5 corresponde a un fenotipo metilador (G-CIMP) el que se observa especialmente en pacientes jóvenes, con LGG y mutados para el gen de la IDH.

En el 2016 se reconoce que la mutación de la IDH es el pilar en la clasificación de los HGG, y David N Louis los divide en GB no mutados (silvestres) y mutados para IDH y usa el termino NOS para los tumores no especificados (“*not otherwise specified*”), conceptos que fueron utilizados en la OMS-4^{ed}, lo cual sirve de base para la OMS-5^{ed} en la que se efectuaron clúster basados en el epigenoma (24) (Tabla 1).

Tabla 1. Evolución en la clasificación de los gliomas difusos tipo adulto Recuento histórico del análisis que llevo a la actual clasificación de los astrocitomas difusos tipo adulto. La mutación de la IDH define si se trata de un A^{MUT-IDH/G3-4} o un GB^{WT-IDH}.

Reporte	Clasificación de los gliomas difusos de tipo adulto derivados de astrocitos			
Phillips, 2008	Proneural		Proliferativo	Mesenquimal
Verhaak, 2010	Proneural		Neural	Clásico Mesenquimal
Brennan, 2013	M5 (G-CIMP)	M6	**	M3, M4 M1, M2
Louis, 2016	IDH mutado		IDH no mutado o silvestre (WT)	
OMS-4 ^{ed} 2016	Astrocitoma anaplásico	GB mutado IDH (10%)	Glioblastoma no mutado para IDH (90%)	
OMS-5 ^{ed} 2021	Astrocitoma (A ^{mut-IDH/G2-4})		Glioblastoma (GB ^{WT-IDH})	

Fuente: elaboración propia

Se han publicado otras clasificaciones basadas en las vías comprometidas (2016), en los genes centrales relacionados con el pronóstico (2019), en los subtipos pronósticos dividiéndolos en invasivo (pobre), mitótico (favorable), e intermedio (2019) y en los subtipos pronósticos basado en la metilación del ADN (2019) los cuales dieron las bases para la última clasificación de los tumores del SNC de la OMS-5^{ed}.

En la actual clasificación OMS-5^{ed}, los gliomas se clasifican como gliomas difusos tipo adulto; gliomas difusos pediátricos que pueden ser de bajo y alto grado; gliomas astrocíticos circunscritos; tumores glioneuronales/neuronales y tumores ependimarios. Los gliomas difusos tipo adulto comprenden el GB^{WT-IDH}, el A^{MUT-IDH} que puede ser grado 2 a 4, y el O^{mut-IDH-codel1p/19q} que puede ser grado 2 o 3. Equivalen a los HGG, el GB^{WT-IDH}, el A^{MUT-IDH} grados 3 y 4, y el O^{mut-IDH-codel1p/19q} grado 3. Según la OMS-5^{ed}, se debe corroborar el diagnóstico buscando la mutación de *pTERT*, de *EGFR* y VNC 7+/10- en GB^{WT-IDH}. En *ATRX*, *PT53*, y *CDKN2AB* para A^{MUT-IDH/G3-4} y de *pTERT*, *CIC*, *FUBP1*, *NOTCH1* para O^{mut-IDH-codel1p/19q}, las cuales se presentan con porcentajes variables (60).

2.1.6 Radioterapia

La RT es una técnica que permite inducir la muerte celular mediante el uso de partículas ionizadas de alta energía que provocan alteraciones en el material genético. Si este daño es directo y severo, la célula tumoral muere por necrosis, pero si es indirecto y sutil sobre el ADN y las organelas, las células van a ir muriendo por apoptosis; debido a esto, es muy importante efectuar una planificación del tratamiento ya que la RT puede dañar al tejido neuro-vascular normal que rodea al tumor.

Es de anotar que autofagia es un mecanismo de protección de las células, mediante el cual estas permanecen en un estado similar a la hibernación (“células dormidas”), conservándose a costa del consumo de sus componentes, y que juegan un papel importante en recaídas posteriores. Los estudios de Walker y colaboradores en 1978, reportaron que el tratamiento con RT adyuvante a la CX provocó un incremento de la mediana de la supervivencia de 14 a 36 semanas cuando se compara con tratamiento de soporte (61), con base en estos resultados la RT se convirtió en el tratamiento estándar hasta comienzos de la década del 2000 (62).

La RT puede aplicarse mediante distintas técnicas; cada una de ellas puede tener diferentes indicaciones. Según el tamaño y grado histológico del tumor, se programa campo, dosis y fraccionamiento (61). Dependiendo de estos parámetros y la susceptibilidad personal, se va a reflejar en respuesta y/o toxicidad.

Se denomina teleterapia, a la técnica mediante la cual se dirigen rayos al tumor desde el exterior, los cuales pueden ser holoencefálicos (todo el encéfalo), focales (lecho tumoral) que a su vez puede ser mediante la técnica de intensidad modulada (IMRT) o muy delimitados y a alta dosis, técnica denominada radiocirugía (SRS/SBRT). La técnica holoencefálicos y la IMRT se efectúan a través de un dispositivo que contiene cobalto o un acelerador y la SRS/SBR, utilizando colimadores en el acelerador, con el gama-knife que tiene fuentes de cobalto o con el ciber-knife que es un acelerador con un brazo mecánico robótico. También se puede colocar material radioactivo directamente al lecho tumoral mediante catéteres, técnica denominada RT intersticial o braquiterapia (63).

En el caso de los HGG, se usa como adyuvancia IMRT, delimitando bien el campo tumoral, para así tratar de minimizar la cantidad de tejido sano circundante irradiado, y con ello, la toxicidad. Usualmente se comienza a las 3-4 semanas tras la CX, tratando de llegar a una dosis total entre 6.000 y 6.400 centigrays (cGys), en fracciones de 150 a 200 cGys día durante 6 semanas, o sea 42 sesiones de lunes a viernes (64). Ocasionalmente se usa SRS/SBR en pacientes con HGG como complemento a la teleterapia inicial o a la recaída, si el volumen tumoral es pequeño y bien delimitado (65). Casi siempre luego de la RT se presentan efectos secundarios, que pueden ser clasificados según el momento de su aparición. Los efectos secundarios agudos son aquellos que se presentan horas o pocos días después del tratamiento como cefalea y obscuraciones que ceden fácilmente con corticosteroides.

El segundo grupo de efectos secundarios son las toxicidades diferidas tempranas, estas pueden aparecer desde la sexta semana hasta seis meses después de finalizado el tratamiento y a este grupo pertenecen los daños neurológicos reversibles el empeoramiento del déficit neurológico y también pueden tratarse con corticoesteroides y por último las toxicidades tardías que aparecen meses a años después de finalizar la RT y se producen por destrucción del tejido cerebral y su sistema vascular y son el daño de la sustancia blanca o leucoencefalopatía, la calcificación de pequeños vasos sanguíneos y la radionecrosis, que causa usualmente una gran inflamación vecina para los cuales fuera de los corticoides, se prescribe bevacizumab o cámara hiperbárica (65).

La RT puede generar daños a través de dos mecanismos de acción: directo, donde induce lesiones sobre el ADN como oxidación de bases, sitios abásicos (sitios AP), quiebres de cadena sencilla (SSB) y quiebres de cadena doble (DSB) e indirecto, generando especies de radicales libres de oxígeno (ROS) que inducen inflamación y muerte celular en los tejidos (66).

Las fallas generadas por la RT, pueden ser explicadas a través de tres factores: el primero, correspondería al conocimiento inexacto del tamaño del tumor, pudiendo conllevar a suministrar campos inadecuados; el segundo, es la agresividad del tumor en la que se combinan mayor proliferación celular, células con mayores mecanismos de agresividad y resistencia, especialmente en las células madre o “*stem cells*” (CGS), mayor angiogénesis y necrosis, finalmente el tercero, incluye algunos factores propios del paciente como serían la mayor o menor susceptibilidad a la RT, cuya combinación originaría en unos casos radionecrosis y en otros radio resistencia (67).

2.1.7 Quimioterapia

En cáncer la meta es encontrar medicamentos en los que se pueda aumentar la eficacia, tratando de minimizar los efectos secundarios. Se dispone de diferentes vías de administración para la QT como la vía oral, intravenosa, intraarterial, intraquística o por convección que consiste en colocar un catéter en el lecho tumoral y suministrar con una presión y tiempo controlados ciertos medicamentos oncológicos (68).

Las diferentes modalidades terapéuticas, tienen como condición poder penetrar la BHE, seguido de que la dosis terapéutica alcance una concentración mínima eficaz en el tumor y finalmente que tenga poca toxicidad (69). La BHE es la responsable de amortiguar el encéfalo, ser una barrera de protección y permitir mantener la homeostasis del cerebro, al posibilitar el paso selectivo de oxígeno y nutrientes que llegan al cerebro a través de la sangre; sin embargo, esta función de BHE representa un obstáculo para el ingreso de fármacos que actúan en el SNC (70).

Los quimioterapéuticos que primero se utilizaron en cáncer fueron los agentes alquilantes, los cuales contribuyen entregando grupos alquilo (alquilación) a macromoléculas como el ADN. Los agentes alquilantes se consideran citostáticos y el principal exponente de la familia es el gas mostaza sulfurado (sintetizado en 1854), utilizado como arma letal en la primera guerra mundial (1914-1918), y

posteriormente utilizado empíricamente en deshollinadores con cáncer de pene aplicado de manera tópica, permitiendo la recuperación del tumor (71). Esta observación, fue la base para la aplicación de un protocolo que confirmó la acción antineoplásica en linfoma murino, y en 1942 se iniciaron estudios clínicos de varias mostazas en pacientes con linfomas, iniciando la era moderna de la QT en cáncer (72).

Pertenece a las mostazas nitrogenadas la mecloretamina, la ciclofosfamida, la ifosfamida, el melfalán y el clorambucilo. Otros componentes de la familia de los alquilantes son las etileneiminas y metilmelaminas como la altretamina y el tiotepa; la procarbazona, derivada de la metilhidrazina; el alquilsulfonato busulfán; las nitrosoureas BCNU, CCNU y la estreptozocina; los triazenos dacarbazina, la TMZ y los complejos de coordinación de platino cisplatino, carboplatino y oxaliplatino (73).

En HGG han demostrado utilidad la nitrosourea BCNU, que se considera citostático. Este se administra intravenoso o en forma local mediante un polímero biodegradable (gliadel) que se aplica en la cavidad quirúrgica durante la CX en una especie de galletas denominados “waffles” (74).

Otra nitrosourea que se ha usado en el manejo de los HGG es el CCNU, usualmente asociada a la procarbazona y la vincristina, en el protocolo denominado PCV, utilizado en Europa y que es considerado equiparable a la terapia con TMZ (75). En los Estados Unidos se utiliza para la recaída de HGG, la asociación de CCNU y la procarbazona sin vincristina (denominado PC). En la actualidad se utiliza el BCNU como tercera línea para la recaída, con un uso limitado debido a su toxicidad hematológica y pulmonar (76).

La TMZ, agente alquilante de segunda generación, perteneciente al grupo de los triazenos, es un derivado metilado del medicamento experimental mitozolomida y es un típico profármaco, alquilante monofuncional tipo SN1 (sustitución nucleofílica unimolecular) que se suministra vía oral (en otra época existía también la presentación parenteral para uso intravenoso). Este se debe suministrar alejado de los alimentos, es muy estable en el pH ácido del estómago, y se absorbe en un 100% en un tiempo máximo de 90 minutos.

Al entrar en contacto con el pH fisiológico de la sangre (7,5 a 7,45, básico), se hidroliza espontáneamente a una especie intermedia, el metabolito monometil triazoboimidazol carboxamida (MTIC) se rompe rápidamente para formar el ion reactivo metildiazonio y el metabolito inactivo 5-amino-imidazol-4-carboxamida

(AIC) que se excreta vía renal. Tiene un aclaramiento plasmático rápido, lo que reduce la probabilidad de efectos adversos sistémicos. Esta reacción no se da en los tejidos normales, ya que su pH es de 5,5 (ácido).

En cuanto a la penetración de la BHE del metildiazonio, se realizó un estudio mediante tomografía de emisión de positrones (PET) marcando la TMZ con ^{11}C -metionina, el cual permitió comprobar como este metabolito altamente reactivo y el verdadero alquilante, capaz de penetrar en el parénquima cerebral y se acumula más en tejido tumoral que en tejido cerebral normal, esta preferencia por tejido tumoral puede ser explicable debido a la diferencia de pH entre el tejido cerebral normal y el tumoral (77).

Las células cancerosas provocan la acidificación de su entorno y, en consecuencia, logran alcalinizar el interior de la propia célula. Esta desregulación debería suponer un problema para el desarrollo y la proliferación de las células, pero en el cáncer ocurre todo lo contrario. Las células cancerosas proliferan menos y de manera menos robusta al acidificar su pH interno y al alcalinizarlo proliferan más (78). Como el pH del tejido tumoral es más básico en comparación con el tejido cerebral circundante, el metildiazonio encuentra a nivel intracelular el nicho óptimo para entregar el grupo metilo al ADN, por lo que esta activación dependiente de pH da lugar a una terapia dirigida (79).

El metildiazonio es un metabolito intermedio inestable (12), que es rápidamente escindido en nitrógeno molecular (N_2) y un ion carbonio CH_3^+ que actúa como elemento "alquilante" (71). Este ion carbonio produce la metilación de algunas bases del ADN, específicamente en la guanina del oxígeno 6 (O^6) y del nitrógeno 7 (N^7); en la adenina del nitrógeno 3 (N^3) de la adenina y del nitrógeno 1 (N^1) y el oxígeno 4 (O^4) de la timina dando origen, entre otros, a la O^6 metilguanina ($\text{O}^{6\text{-mG}}$), N7-metilguanina ($\text{N}^{7\text{-mG}}$) y N3-metiladenina ($\text{N}^{3\text{-mA}}$) que van a causar unas bases no coincidentes que dan como resultado roturas de ADN y finalmente inducen la detención del ciclo celular en fase G2/M y la muerte de las células cancerosas.

En relación con su cito-genotoxicidad, se describieron los centros nucleofílicos más comúnmente accesibles a metilación en los nucleótidos del ADN y que son el O^6 y el N^7 de la guanina, los N^3 y N^1 de la adenina y el O^4 de la timina. Sus efectos y toxicidades son diferentes dependiendo de varios factores, por ejemplo, las posiciones O^6 y N^7 de la guanina tienen el mayor potencial electrostático negativo en el ADN de doble cadena, seguido del N^3 de la adenina.

También influyen su ubicación en el surco mayor o menor del ADN, y si la célula está en fase proliferativa o quiescente. La genotoxicidad por aductos es mayor

cuando la célula atraviesa la fase S del ciclo celular ya que los aductos generan mini-paradas en la horquilla de replicación, DSB, retrasos en la fase G2, y activación de puntos de chequeo (“*checkpoints*”) que conducen a muerte celular (80). Es de resaltar que, en la TMZ, la citotoxicidad depende principalmente del aducto tóxico O⁶-MeG, o sea la metilación en la posición O⁶ de la guanina en el ADN genómico, pero en su mecanismo de acción están implicadas otras vías ya anteriormente descritas (81).

La N^{7-mG} y la N^{3-mA} son reparados por la vía de reparación por escisión de bases (BER) ya que la alquilpurina-ADN-N-glicosilasa (APNG), inicia la BER eliminando las lesiones de la base de la N^{7-mG} y la N^{3-mA} inducidas por TMZ, dejando sitios AP o sea apurínico/apirimidimico en el ADN para su posterior procesamiento por parte de la BER, pero la O^{6-mG}, que es la menos frecuente de los tres nucleótidos metilados, es reparada por un sistema de escisión de bases (MMR) considerado ineficiente o fútil, ya que solo repara una de las dos cadenas o sea la que contiene la O^{6-mG}, quedando intacta y con tendencia a acumularse la cadena de apareamiento que tiene equivocadamente timina (T) en vez de citosina (C), lo cual llevara a activar los mecanismos de apoptosis (82).

Las lesiones pro-mutagénicas (alquilaciones) inducidas por la TMZ en la posición O⁶ de la guanina, son removidas por la enzima MGMT que actúa de manera “suicida” al transferir un grupo alquilo de la guanina a un grupo sulfuro de una cisteína, inactivándose a sí misma de manera irreversible (83). En ese caso se requeriría síntesis de nuevas moléculas de MGMT para remover alquilaciones adicionales. El escenario terapéutico, para que la TMZ tenga un efecto clínico relevante, requiere la conjunción de varios factores como son la división celular, bajos o nulos niveles de la enzima de reparación (MGMT), y la presencia activa de los sistemas de reparación MMR ineficiente que lleva a apoptosis y la disfunción de BER, su iniciador APNG o poli [ADP-ribosa] polimerasa 1 (PARP1) que reparan N⁷ y N³ (84).

El otro mecanismo de acción de la TMZ sería que a partir de las abundantes alquilaciones generadas por TMZ se dispare una respuesta rápida de reparación, iniciada por MGMT, pero que al estar ausente o en bajas concentraciones, dejan de removerse distintos tipos de alquilaciones, que conllevan a que se disparen los mecanismos de reparación MMR y BER, que son rápidamente saturados o rebozados por la magnitud del daño.

En consecuencia, si los niveles de MGMT están disminuidos o nulos como ocurre en muchos gliomas (45% de los GB) y los sistemas de reparación están

saturados, el efecto citotóxico se potencia ante la presencia de alquilaciones abundantes en el ADN que llevan a retrasos en el ciclo celular, lesiones graves tipo DSB y muerte celular, estas lesiones son aún más citotóxicas si la célula está atravesando por la fase S, lo cual solo ocurre en las células proliferativas, en cambio, las células no proliferativas, y que tengan activos los mecanismos de reparación vía MGMT, MMR y BER, APNG y PARP tendrían toxicidad diferencial disminuida o mínima, lo cual explica la poca respuesta en los LGG y la baja toxicidad (tolerancia) de la TMZ en tejidos normales (85) (Figura 1).

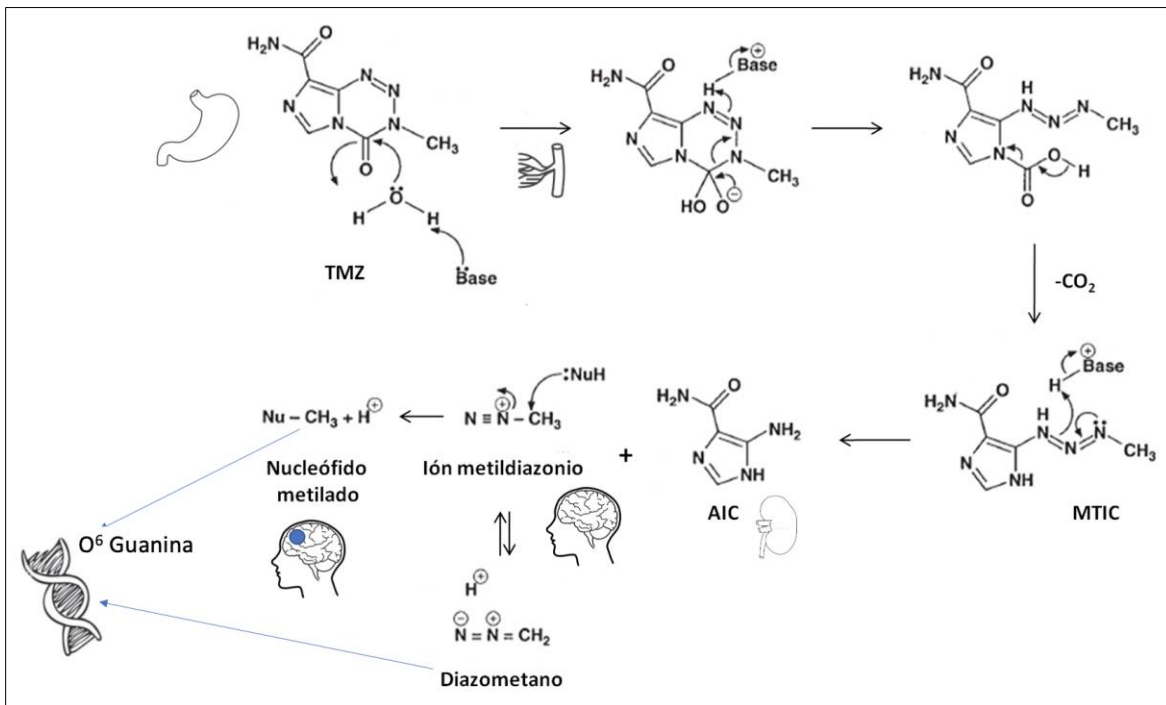


Figura 1. Metabolismo de la TMZ a su forma activa. La TMZ es estable a pH ácido, el paso mucoso gástrica-sangre es del 100%, en pH básico se hidroliza a MTIC y este en AIC y el ion reactivo metildiazonio que pasa BHE, concentrándose especialmente en medio básico de tumor y se escinde en N₂ y CH₃⁺, alquilante.

Fuente: elaboración propia.

En el proceso oxidativo que conduce a la activación de la temozolomida, pueden formarse otros radicales libres capaces de provocar degradación del ADN e incluso roturas cromosómicas. Más allá de la alquilación del ADN, la TMZ lleva a que se afecten los cambios fenotípicos de las células de los HGG a través de eventos de vías de señalización genómica y molecular y todo ello conlleva a la

detención de la célula en la fase G2-M, y en última instancia, a la muerte celular usualmente programada (86).

Las dosis orales de TMZ usadas para los diferentes esquemas de tratamiento, se muestran en la tabla 2, tanto para casos de diagnóstico nuevo, como para casos recurrentes (87). Es de anotar que la TMZ tienen otras indicaciones como carcinomas neuroendocrinos y adenomas de hipófisis (88–100).

Tabla 2. Diferentes esquemas de administración de temozolomida. El PS incluye TMZ concomitante con la radioterapia y adyuvante. A la recaída, tratando de evitar el efecto de la MGMT, se puede utilizar TMZm, o sea a dosis bajas y continuas o dosis densas, alternando la TMZ semanal o suministrándolo tres semanas, seguido de una semana de descanso.

En momento	qué Protocolo	Dosis de temozolomida
Al diagnóstico	Protocolo Stupp (PS)	Concomitancia: 75 mg/m ² día x 42 días Adyuvancia: 150-200 mg/mt ² día 1 a 5/28 días por 6 ciclos
	TMZ Metronómica (TMZm)	50 mg/mt ² día, continua
A la recaída	TMZ dosis densas (ddTMZ) Ciclos cada 28 días	Una semana “on” y una semana “off” de TMZ a dosis de 120 mg/mt ² Tres semanas “on” y una semana “off” a dosis de 80 mg/m ²

Fuente: elaboración propia.

2.1.7.1 Protocolo Stupp

En 1999, Esteller y cols. publicaron un artículo sobre la inactivación del gen de reparación del ADN, la MGMT por hipermetilación del promotor en cáncer (6). En el 2002, en un estudio fase II se demuestra el efecto benéfico de la adición de TMZ a la RT, constituyendo lo que hoy se conoce como PS en honor al investigador (101). Tres años después este mismo autor en un estudio fase III utilizando el PS vs solo RT(Figura 2), reportó a los 28 meses de seguimiento una

sobrevida global (OS) de 12,1 meses con solo RT versus 14,6 meses con el PS en los pacientes con gliomas de alto grado recién diagnosticados (102).

Al analizar los resultados obtenidos al cabo de 2 y 5 años de seguimiento se encontró una sobrevida hasta 20% en los pacientes tratados con este PS versus el 1.9% de los que solo recibieron RT, lo cual fue corroborado por otras investigaciones (68). El PS, fue aprobado por la Agencia de Medicinas Europea (EMA), el 26-01-1999, por la FDA el 5 de marzo de 2005; y por el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos de Colombia (INVIMA), acta N° 07 de 2014 como terapia estándar en los pacientes con GB recién diagnosticado y en GB y AA recidivantes.

En la práctica clínica es usual hacer una modificación al PS cuando se identifica mayor agresividad del tumor. Esta modificación consiste en dar más 6 ciclos y este aumento no constituye un mayor riesgo dado que no se ha reportado toxicidad acumulativa, sin embargo, un metaanálisis publicado en 2012 reporta que no hay mejoría de la OS con esta conducta (106). El manejo del más frecuente y agresivo de los HGG, el GB (y cuyo análisis en general se infiere a los otros HGG), consiste en hacer CX de resección macroscópica completa (mayor del 90%), ya que resecciones parciales equivalen a biopsia y acarrear un factor pronóstico deletéreo (48).

Luego de CX y en un periodo contemplado entre cuatro y seis semanas después de esta, se inicia la concomitancia donde se dan simultáneamente RT y QT, durante 6 semanas, con dosis de radioterapia entre 6000 y 6400 cGys en fracciones de 150 a 200 cGys al día concomitantemente con TMZ a dosis de 50-75 mg/mt² día, continuo (5).

La RT se enfoca al volumen tumoral con un margen de 2 a 3 centímetros a su límite externo; en general se utiliza IMRT. Esta se planea con base en una imagen reciente y un sistema tridimensional, efectuándose así radioterapia conformacional con acelerador lineal y energía nominal de 6 megavoltios (MV) o más. Se realiza control de calidad antes y durante el procedimiento para cada caso individualmente (101).

Como parte de dicho PS se inicia entonces concomitantemente QT con TMZ, una media hora antes de la RT, a una dosis de 50-75 mg/mt²/día, durante 7 días a la semana, desde el primer al último día de RT, incluyendo los sábados y festivos, pero por no más de 42 días; al terminar la concomitancia viene un periodo de 4 semanas de descanso, posteriormente los pacientes comienzan a recibir la

adyuvancia con 6 ciclos de TMZ, cada uno de 5 días y comenzando ciclo cada 28 días, con una dosis inicial de 150 mg/mt² (primer ciclo), incrementándose la dosis a 200 mg/mt² (segundo ciclo), dosis que se mantiene en los 4 ciclos restantes si no ocurren efectos adversos, especialmente hematológicos (Figura 2) (68).

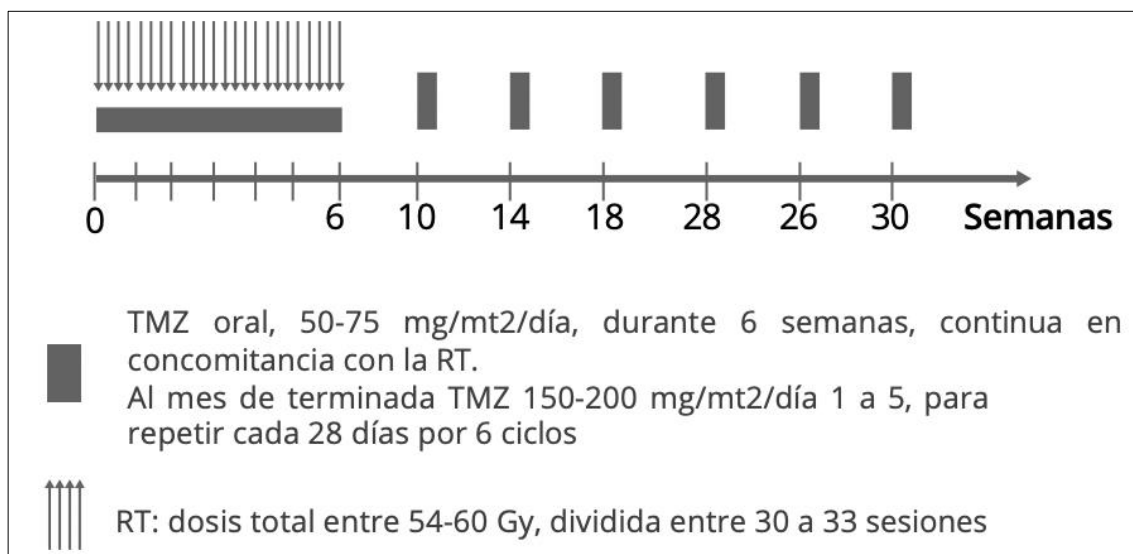


Figura 2. Protocolo Stupp. El PS consiste en suministrar radioterapia (irradiación focal fraccionada en fracciones diarias de 2 Gy administrada 5 días a la semana durante 6 semanas, para un total de 60 Gy) más TMZ diaria continua desde el primer hasta el último día de radioterapia, seguido de seis ciclos de TMZ adyuvante.

Fuente: elaboración propia.

Combinar QT con RT ha mejorado significativamente los resultados clínicos de varios tumores sólidos. Luego de la publicación de los trabajos de Stupp se efectuaron estudios con murinos y cultivos celulares, en los que se corroboró que la TMZ actúa como un radio sensibilizante (64). En relación con otros HGG diferentes a GB, un estudio reciente fase III aleatorizado, abierto con un diseño factorial 2 × 2 también demuestra la utilidad de la TMZ en AA. Se hizo un análisis intermedio planificado después de que ocurrieran 219 (41%) muertes para probar la hipótesis nula de falta de eficacia (umbral de rechazo p<0,0084).

En el momento del análisis intermedio (interino), se habían inscrito 745 (99 %) de los 748 pacientes planificados. Con el uso de TMZ adyuvante el HR fue de 0,65 (95%IC 0,45-0,93). La OS a los 5 años fue del 55,9% (IC del 95%: 47,2 - 63,8) con y del 44,1% (36,3-51,6) sin TMZ adyuvante. Se observaron eventos adversos de grado 3 - 4 en el 8 -12% de los 549 pacientes a los que se les asignó TMZ, y

fueron principalmente hematológicos y reversibles. Se concluye que la QT adyuvante con TMZ se asoció con un beneficio de supervivencia significativo en pacientes con astrocitoma anaplásico sin codelección recién diagnosticado (107).

En relación con el grupo etario de la tercera edad, esto es, mayores de 70 años se puede suministrar la PS si el estado funcional lo permite, pero usualmente se da solo RT, quedando la alternativa de TMZ en los no metilados (65).

2.1.7.2 Alquilguanina-ADN-alquiltransferasa (MGMT)

El nombre del grupo alquilo se deriva de alcano, al que se agrega la terminación radical *-ilo*. Es un sustituyente que se origina por la separación de un átomo de hidrogeno de un hidrocarburo saturado o alcano, para que así el alcano pueda enlazarse a otro átomo o grupo de átomos. Se podría pensar que un grupo alquilo puede formarse a partir de un alcano, pero estos grupos no existen por separado (en ese caso se llaman radicales alquilo), o sea, los grupos alquilo no son compuestos en sí mismos, sino partes de compuestos mayores.

Así, si separamos un hidrogeno de un metano (CH₄) nos quedaría el grupo metilo (CH₃-) altamente reactivo y responsable de originar la O⁶ metilguanina por la TMZ (108) que es uno de los eventos más críticos que permiten la inducción de mutaciones de transición y cáncer. Esta alquilación lleva a un apareamiento erróneo de nucleótidos, una reparación inadecuada de este y la acumulación de cadenas con guanina metilada, se forma un entrecruzamiento entre las cadenas de ADN adyacentes (cromátides hermanas). Ese entrecruzamiento es inhibido por la enzima MGMT que rápidamente revierte la alquilación O⁶ de la guanina. Mecanismo por el cual la MGMT, causa la resistencia a drogas alquilantes (100).

Si bien el papel de la MGMT es evitar estas mutaciones de transición que lleven al cáncer, paradójicamente, bloquea el mecanismo de acción de la TMZ. Es conocido que la metilación del promotor es un actor pronostico y predictor de respuesta independientemente del tratamiento. Al comparar RT y PS o sea la adición de TMZ a la RT, se observó que disminuye el riesgo de muerte en 49% (HR para muerte 0.51, IC95% 0,31-0.84) en los que tienen metilado el promotor por reacción en cadena de polimerasa (PCR) y en un 31% (HR para muerte 0,69, IC95%0,47-1,02) en quienes no lo tienen metilado (7). Se considera por lo tanto , la expresión de la MGMT un factor de resistencia frente al tratamiento (12).

A nivel celular, MGMT se expresa en varios tejidos de una manera variable. su gen se localiza en el cromosoma 10q26 y contiene 5 exones y 4 intrones. La

región del promotor es rica en islas CpG, carece de caja TATA y CAAT y tiene diez sitios Sp1 de unión a factores de transcripción y dos elementos de respuesta a glucocorticoides (GREs). Dicho promotor tiene una secuencia de 1.2 kb que incluye el primer exón y parte del primer intrón (109). La MGMT tiene como función la reparación del ADN eliminando residuos alquilantes del átomo O⁶ de la guanina en el ADN provocados por la acción de agentes alquilantes como la TMZ (110).

Los niveles de MGMT varían dependiendo del tipo de tumor e incluso dentro del mismo tipo de tumor. Por ejemplo, un 30% de los gliomas (45% de los GB) no tienen metilado el promotor de la MGMT y la enzima puede incrementar la resistencia de estos tumores del SNC a agentes alquilantes. Como el gen *MGMT* normalmente no está mutado ni tiene deleciones, la disminución de la transcripción de la enzima se debe a cambios que no dependen de mutación del gen, como puede ser la metilación. Una metilación en sitios normalmente no metilados, como son las islas CpG en regiones del promotor y el primer intrón se correlaciona con pérdida de expresión genética en líneas celulares de cáncer y en gliomas. Una metilación de las islas CpG en el promotor de MGMT impide la transcripción del gen y por lo tanto impide que se reparen las alquilaciones O⁶ de la guanina (Figura 3) (111).

El silenciamiento epigenético del gen *MGMT* mediante la metilación de su promotor está asociado a una mayor supervivencia en pacientes con GB, que además de la RT, reciben TMZ. Se ha observado una correlación entre los niveles de MGMT y el nivel de respuesta a QT y la RT. El estudio fase III del Dr. Roger Stupp, permitió la introducción de la PS (5). y en un análisis posterior de este la Dra. Monika Hegi encontró aplicando la técnica de PCR que el promotor del gen *MGMT* estaba metilado en 45% de 206 GB evaluados. Si bien el mayor beneficio se observa en los pacientes que tienen metilado el promotor (SLP con RT sola 5,9 meses vs más TMZ 10,3 meses, $p=0,001$), también responden algunos pacientes que no lo tienen metilado (SLP con RT sola 4,4 meses vs. más TMZ 5,3 meses, $p=0,02$), por lo que todos los pacientes adultos, menores de 70 años, reciben el PS (58).

En otros estudios han documentado que aproximadamente del 35% al 60% de los pacientes con GB que tenían metilado el promotor de la MGMT presentaban una tasa de supervivencia mayor. Se compararon pacientes con el promotor no metilado que recibieron RT más TMZ con pacientes metilados que recibieron solo RT obteniéndose resultados discretamente superiores a los que recibieron

únicamente radioterapia, aunque ambos subgrupos tuvieron peor respuesta que los pacientes con MGMT metilados que recibieron PS (81,102,106,112,113).

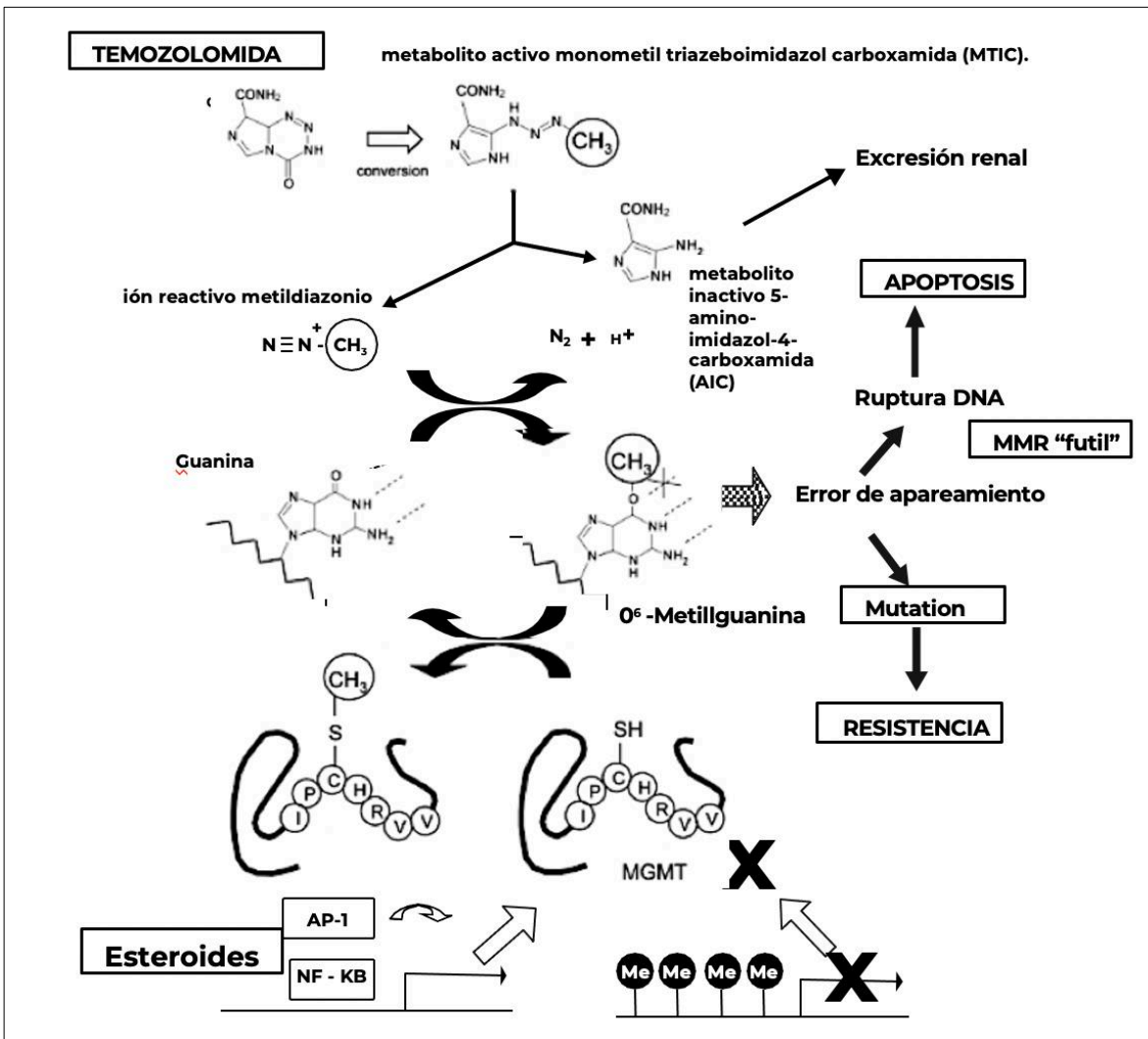


Figura 3. Papel de la MGMT, para revertir el efecto de la TMZ. La enzima de reparación metilguanina-O⁶-metiltransferasa (MGMT) repara el ADN a través de la eliminación directa de un grupo alquilo (CH_3) del átomo O⁶ de la guanina en el ADN de las células expuestas a agentes alquilante, “robándose” a través de un grupo sulfhidrido (SH), formando el compuesto CH_3-SH metanotiol (114).

Fuente: *Modificado de Newton HB. Handbook of brain tumor chemotherapy, molecular therapeutics, and immunotherapy. 2nd edition. Waltham, MA: Elsevier; 2018.

Con respecto a la regulación clínica de la MGMT, el descubrimiento de que altos niveles de MGMT son responsables, al menos en parte, de la resistencia de las células tumorales a los triazenos (compuesto orgánico que contiene el grupo funcional $-N(H)-N=N-$ como la dacarbazina y la TMZ), estimuló la búsqueda de

programas para sintetizar compuestos que regularan la actividad de MGMT. Actualmente, el O⁶- benzilguanina (O⁶-BG), y el O⁶- (4-bromoteny) guanine (Lomeguatrib/PaTrin-2), son los más utilizados en clínica (115).

2.1.8 Progresión y recaída

Se observa progresión en un 40% de los pacientes con GB a pesar del PS (117). Los datos del modelo de xenoinjerto de GB ortotópico han revelado que la capacidad de respuesta de TMZ se correlaciona inversamente con el nivel de proteína MGMT celular y a su vez con la ausencia de metilación del promotor de *MGMT*. La pérdida de metilación del promotor de *MGMT* está asociada con la resistencia intrínseca a TMZ (118). Los pacientes con GB primario con metilación del promotor de *MGMT* tuvieron una mediana de supervivencia prolongada (aproximadamente cinco meses) en comparación con los pacientes sin metilación del promotor de *MGMT* (119). Es de anotar que aproximadamente el 45% de los GB son deficientes en *MGMT* y aun así algunos de ellos presentan resistencia primaria a la TMZ, indicando de que deben existir otros mecanismos de resistencia intrínseca o primaria implicados (79).

En cuanto a la recaída, esta se observa que de un 85% a 90% de los pacientes con GB que tienen una respuesta inicial a la TMZ. Usualmente se presenta un incremento del tamaño del tumor no resecado quirúrgicamente o la aparición de nuevas lesiones tumorales en el lecho tumoral o su vecindad. Solo 5% a 10% de los pacientes con GB tienen sobrevidas largas, lo que en la literatura se ha denominado respondedores excepcionales (120).

La pseudo progresión se define como el aumento del edema y en ocasiones de los diámetros del tumor a los pocos meses de iniciado el PS. Ocurre en el 30% de los pacientes, y generalmente se interpreta como una falla terapéutica ya que hay deterioro clínico y paraclínico creando una falsa impresión de progresión clínica y/o radiológica, es usualmente reversible con tratamiento antiinflamatorio y antiedema y ocurre generalmente de 1 a 3 meses tras el tratamiento concomitante (121).

De requerirse anticonvulsivantes, la mejor opción es el levetiracetam, que es el que menos interfiere con el metabolismo hepático de la TMZ a nivel de la p450 hepática, lo cual disminuye la posibilidad de recaída (122).

2.1.8.1 TMZ dosis metronómicas (TMZm)

Como se anotó, la recaída se da por resistencia secundaria o adquirida (123). Los sistemas de reparación más importantes implicados en el mecanismo de acción de los triazenos son MMR y BER. El sistema MMR trata de reparar el daño ocasionado por la TMZ al metilar la guanina del ADN convirtiéndola en O⁶-MeG, la cual, en vez de aparearse con citosina, se aparea con timina. MMR repara solo la cadena que tiene la timina mal apareada mas no la que tiene O⁶-m, la cual se va acumulando, llevando la célula tumoral a apoptosis. El sistema BER (iniciado por APNG) y PARP1 que es una proteína de detección de daños en el ADN es capaz de unirse a roturas de cadena producidas por agentes genotóxicos, así como señalar el daño en el ADN a los complejos de reparación, provocan resistencia al tratamiento ya que reparan adecuadamente a N⁷-mG y N³-mA ocasionados por la TMZ (87).

En un metaanálisis realizado para evaluar la eficacia general de TMZ en el tratamiento del GB recurrente, se hizo una búsqueda de estudios relevantes en Medline, EMBASE y Cochrane; se analizaron un total de 15 ensayos clínicos de fase II que incluyeron 902 GB recurrentes. La tasa de beneficio clínico general fue del 50,5 % (IC95%: 44,3–56,7%) con una diferencia significativa entre el esquema de suministro metronómico y estándar (ciclos 5/28) de TMZ (61,4% frente a 46,3 %, P=0,037).

Se encontró que la tasa general de SLP a los 6 meses (PFS-6m) fue del 27,8% (IC95%: 22,7-33,5%) con una diferencia significativa entre los programas metronómico y estándar (33,1% metronómico frente a 20,1% estándar, P<0,001). Además, se detectó una diferencia significativa en la PFS-6m entre los programas metronómicos de dosis alta (dosis diaria promedio >100 mg/m²) y baja (dosis diaria promedio 100 mg/m²) (RR=1,57, IC95%: 1,17-2,09, P=0,002). Las tasas generales de OS a los 6 meses (OS-6m) y a los 12 meses (OS-12m) fueron del 65,0% (IC95%: 57,4-71,9 %) y del 36,4% (IC95%: 26,9-47,1%) respectivamente (124).

Desde el punto de vista económico no hubo diferencia significativa en OS-6m entre los programas metronómico y estándar (P=0,266); sin embargo, se observó una tendencia a favor del programa metronómico para OS-12m (P=0,089). Se concluye que la TMZ es efectivo para los GB recurrentes, y su eficacia puede aumentar con un programa metronómico y una dosis diaria promedio alta (> 100 mg/m²) (124).

2.1.8.2 Otras opciones ante la recaída o progresión

Ante la progresión o la recaída, no hay un protocolo de manejo estandarizado. En algunos centros se utiliza TMZm o dosis densas, sola o asociada a bevacizumab. Con estos nuevos esquemas, se trata de evitar la MGMT, la cual tiene una vida media corta. El bevacizumab es un anti angiogénico que tiene, fuera del efecto antitumoral un efecto antiedema. Se trato de introducir en la primera línea asociado a la PS, pero al mejorar solo la SLP y no la OS (125,126), solo está aprobado para la recaída, asociado a TMZm o a irinotecan (127). Donde se tiene el recurso del medicamento CCNU, este se asocia este con procarbazona (128) y con vincristina en un protocolo denominado (PCV). El BCNU, que se utilizada de primera línea antes de la llegada de la TMZ, por su escasa efectividad y alta toxicidad hematológica y pulmonar, ha quedado relegado a tercera línea (129) y donde se tiene el recurso del medicamento CCNU, se asocia este con procarbazona con VCR (PCV), o sin este (PC) (128).

Se está analizando el papel de la inmunoterapia (130) y el uso de regorafenib (131) entre otros (132). Se ha evaluado en los pacientes con recaídas de GB, el uso de agentes que se dirigen a los mecanismos propios de las células tumorales (terapia blanco) y de acuerdo a su sitio de acción pueden ser: dirigidos a lesionar el ADN de la célula tumoral, sus mecanismos de reparación y su integridad (incluidos enfoques para alquilación de ADN, PARP, ADN-proteína-quinasa e inhibición de telomerasa) (132).

A los determinantes epigenéticos de la estructura de la cromatina y la transcripción de genes, incluidas la histona deacetilasa e inhibidores de la metilasa (133). A moduladores del ciclo celular y la apoptosis (incluyendo los inhibidores de CDK4/6; fármacos que interfieren con el huso mitótico, inhibidores de MDM2, Wee-1, proteína fosfatasa secundaria y activadores de caspasa (134). A la homeostasis de proteínas (incluidos inhibidores del proteasoma y nedilación) y vías de señalización celular, incluidos los inhibidores de EGFR, c-kit, PI3K/AKT/mTOR y MEK y letalidad sintética (21). Pero a la fecha, ninguno de ellos ha podido superar la PS en primera línea, ni a TMZm a la recaída (17,135,136).

2.1.9 Tratamiento en Colombia

En un estudio bidireccional con 171 pacientes con HGG tratados con PS en el IdeC de la CLA y la Fundación Santafé de Bogotá (FSFB), se encontró que la edad promedio era de 56 años (17 - 84 años); 97 pacientes eran hombres (56%); 82% tenían GB y de estos el 62% fueron primarios. Un 55% de los casos fueron

tratados con CX de citoreducción macroscópica completa y 23% fueron llevados a solo biopsia (16).

El 77% de los pacientes completó la PS, con una media de dosis de radiación de 5.800 cGys (r 1.800 - 6.400) y un número promedio de 5 ciclos de TMZ (SD+/-3). Se documentó pseudo-progresión en el 20%; OS-6m fue de 15,8 meses (IC95%: 11,9-19,7 meses) y el tiempo total a la progresión (TTP) fue de 9,5 (IC95%: 8,3 - 12,7 meses). La tasa de sobrevida a uno y dos años fue de 69% y 31% respectivamente.

Los pacientes con un KPS mayor de 70% mostraron una mayor sobrevida ($p=0,05$), así como aquellos con un mejor puntaje en el análisis de partición recursiva (RPA) ($p=0,04$) y sin multicentricidad ($p=0,049$). El 42% de los pacientes fueron tratados con terapia de segunda línea, de los cuales 32 recibieron BEV con otro medicamento incluyendo dosis TMZm; 24 recibieron dosis metronómicas o dosis densas de TMZ; 14 recibieron BCNU y dos otros medicamentos a la recurrencia. Encontrando que el tratamiento y la sobrevida en estas dos instituciones se ajusta a lo reportado en centros de referencia mundial ((16).

2.2 Secuenciación de nueva generación

El análisis de laboratorio de las alteraciones genéticas, epigenéticas de ARN mensajero (y no codificante) y de proteínas se puede dividir en antes y después de la secuenciación de próxima o nueva generación (NGS) (137). Preconizados en la era pre genómica, y aun con utilidad en ciertos casos, se utilizan la prueba del Southern blotting para analizar fragmentos de ADN y el Northern para detección del ARN y para el análisis de proteínas, el Western permite caracterizarlas y el Eastern, ver sus cambios postraduccionales (138).

El análisis genómico por NGS de un tumor maligno, permite clasificarlo y puede proporcionar información sobre su susceptibilidad o resistencia a terapias particulares y esta información puede ser crítica para la elección del tratamiento (139). Hay muchos enfoques para caracterizar la genética del cáncer de un paciente, que va desde el examen de la secuencia de un solo gen, hasta la secuenciación del genoma completo. Cada decisión tomada a lo largo del proceso influye en los resultados, desde la forma en que se recolecta la muestra hasta el enfoque de secuenciación utilizado y la forma en que se realiza el análisis (140) que puede ayudar a identificar las mutaciones conductoras o “*drivers*” (141).

1.1.2 Tipo de muestra

El cáncer es una enfermedad del genoma y la genética del cáncer de un individuo puede decir cuál será el comportamiento de ese cáncer y cuál es la mejor forma de tratarlo. El proceso que permite determinar la genética del cáncer de un individuo inicia con la recolección de la muestra (puede ser sólida o líquida) para su análisis y las características de esa muestra pueden tener implicaciones importantes para los datos a obtener (142).

La muestra sólida se obtiene al tomar una muestra de tejido, usualmente por una biopsia por trucut tomada por neuroradiólogo o escisional por el neurocirujano o al haber resecado una lesión tumoral, de ser posible con patólogo presente. Ocasionalmente se preserva una porción de tejido fresco en nitrógeno líquido (ideal para el análisis de ARN mensajero y ARN no codificante), pero el procedimiento más frecuente es enviar el tejido, embebido en formol, debidamente marcado al departamento de patología, donde luego es inmerso en bloques de parafina para procesarlo mediante finos cortes con un micrótopo para colocarlo en placas histológicas y hacer las coloraciones de H-E y IHQ y proceder a fijarlo y poder efectuar un diagnóstico inicial (143).

Parte de este mismo tejido se puede utilizar para hacer la NGS (144). Es de anotar que la muestra a procesar para NGS es previamente analizada por patólogo, para asegurar que sea de buena calidad y que contenga células cancerosas y en cuyo informe se anota la pureza del tumor (Figura 4) (145).

La biopsia líquida consiste en la toma de muestra de algún líquido corporal, ya sea sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR), pleural, ascítico, etc. para buscar y analizar células de tumor circulantes (CTC), proteínas circulantes asociadas al tumor, vesículas extracelulares (VE), exosomas, ácidos nucleicos libres de células tumorales (CF-NAS) como ADN circulante (ctADN) y miARNs (146).

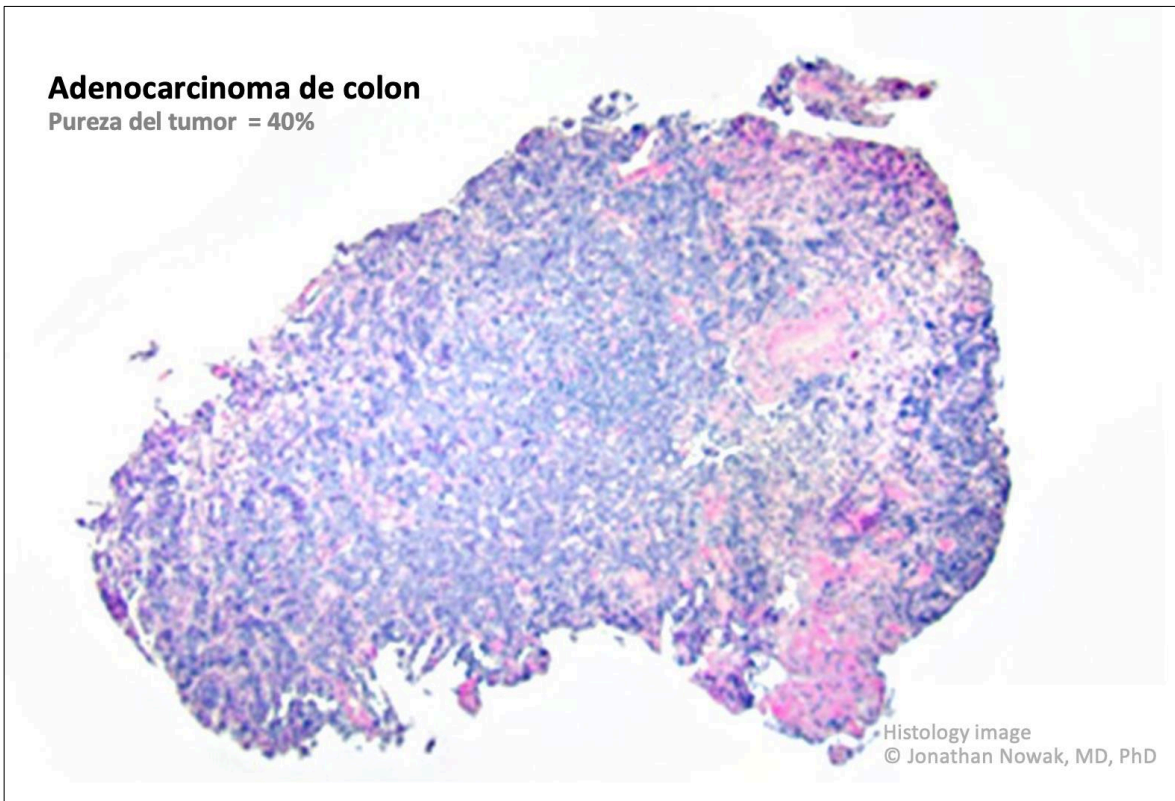


Figura 4. Pureza del tumor. Muestra en la que el patólogo molecular seleccionó una muestra representativa de tumor, calculando la pureza de la muestra en un 40%, siendo el 60% restante tejido vecino normal.

Fuente: tomada de HHMX Pro Genetics – Cáncer Genomics and Precisión Oncology.

Los HGG son heterogéneos por lo que se deben analizar muestras de diferentes sitios del tumor y se recomienda cotejarlo con una biopsia líquida (147). Si la alteración está en todas las muestras, o sea en varios sitios del tumor, el tejido vecino sano y la biopsia líquida, se trata de un tumor germinal, si solo está en algunas, es somático. Si en las recaídas es posible tomar muestras sólidas del tumor, o muestras líquidas por recaídas o como parte del seguimiento, se podrá observar como este va a ir cambiando desde el punto de vista genético y epigenético (Figura 5) (148).

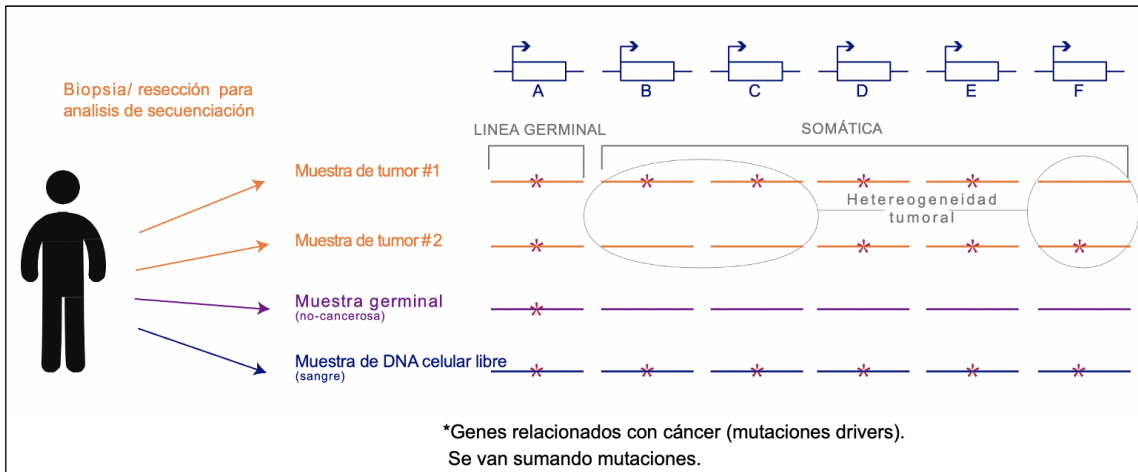


Figura 5. Tipos de muestra. Ya que la mayoría de los tumores son heterogéneos, es ideal tener varias muestras de un mismo tumor. Se debe analizar también el tejido vecino normal y de ser posible una biopsia líquida. Si la mutación está en las 4 muestras. El tumor viene de la línea germinal, de no ser así, es un tumor somático. Comparando las muestras tumorales y la biopsia líquida, se puede observar la heterogeneidad y como se van seleccionando ciertas mutaciones drivers.

Fuente: modificado de HHMX Pro Genetics – Cáncer Genomics and Precisión Oncology.

La biopsia líquida es altamente sensible y específica, con un potencial enorme no solo para servir como prueba de tamizaje en población normal; para diagnóstico no invasivo en pacientes en quienes se sospeche determinado tipo de malignidad o para el seguimiento de pacientes ya diagnosticados con cáncer en quienes se quiera evaluar la respuesta farmacológica, entre otras (147).

Las mutaciones detectadas pueden ser conductoras (driver: impulsan la progresión del cáncer), o pasajeras (epigenómica: sin mayor connotación patogénica); una vez identificadas, es necesario tener soporte de la literatura que ayude a explicar las implicaciones de la alteración genética en el desarrollo y evolución del cáncer (149).

Un 5 a 10% de los pacientes tienen cáncer hereditario (150) y hay varios síndromes genéticos asociados con un mayor riesgo de glioma como la neurofibromatosis 1 y 2 (mutación en los genes *NF1* y *NF2*), la esclerosis tuberosa (en los genes *TSC 1* y *2*), el síndrome de Lynch (en los genes *MSH2*, *MLH1*, *MSH6*, *PMS2*), el síndrome Li-Fraumeni (en el gen *TP53*), el síndrome de susceptibilidad melanoma-oligodendroglioma (en el gen *POT1*), el síndrome del sistema tumor melanoma-neuronal (en el gen *CDKN2A*) y en la enfermedad de

Ollier/síndrome de Maffucci (en los genes *IDH 1 y 2*) (151). En el caso de los tumores somáticos, en los cuales los cambios genómicos se limitan al tumor, es importante el soporte de la literatura y ver que mutaciones se repiten con más frecuencia en las diferentes biopsias tomadas del tumor original (152).

2.2.1 Elaboración de la secuenciación

Una vez se tiene una muestra de la lesión neoplásica, que puede ser una biopsia líquida o tejido tumoral fresco en nitrógeno líquido o de tejido embebido en parafina, esta se puede utilizar para efectuar la secuenciación (153). Se puede secuenciar todo el genoma, los exones, intrones o ciertos genes de interés, en este caso, los que se han relacionado con cáncer.

La secuenciación del genoma completo se hace cuando se están haciendo protocolos de investigación, por ejemplo, para detectar nuevos genes implicados en el desarrollo de cáncer, pero en un paciente esto sería muy costoso y la cantidad de información que se obtendría sería difícil de interpretar, por lo que, en un paciente con una neoplasia maligna específica, usualmente se evalúan genes ya identificados, con implicaciones pronósticos y predictores de respuesta para esa neoplasia (154). Se debe tener en cuenta que se puede hacer secuenciación para detectar alteraciones en el ADN, el ARN mensajero (ARNm), ARN no codificante, a nivel epigenético luego del uso de bisulfito e inclusive hacer inferencia en la variación del número de copias (VNC) (155) .

Para la secuenciación del ADN, luego de que un patólogo selecciona el tejido tumoral y que la muestra está libre de parafina, se debe extraer el ADN y ello se hace rompiendo los millones de células de la muestra y purificando el ADN allí contenido. Con este ADN purificado, se pueden hacer pruebas como en Southern Blotting para analizar uno o varios genes, pero la NGS ha hecho posible observar en paralelo muchos genes al mismo tiempo, inclusive, hacer el análisis de las muestras de varios pacientes simultáneamente (156).

El paso siguiente es la fragmentación donde las largas hebras de ADN cromosómico se descomponen en fragmentos cortos. Estos fragmentos de ADN van a permitir generar lo que se denomina librería de secuenciación. Es de anotar que estos fragmentos tendrán doble cadena por lo que se separan a cadena sencilla con calor, lo cual se denomina desnaturalización, a cada uno de estos fragmentos se le une unas secuencias adaptadoras denominados cebos o sondas ("*primers*" por su denominación en inglés), que son una especie de código de

barras cuya secuencia ya se conoce y se ha seleccionado dependiendo del conjunto de genes que se desean analizar, para esta investigación 324 genes que están involucrados en la génesis y posterior evolución de cáncer (157).

Estos adaptadores van a buscar su secuencia complementaria en un panel, que a su vez tiene un imán que atrae los adaptadores. Luego de que la primera calza en el panel, teniendo unido un fragmento de ADN, se procede a hacer PCR de cada uno de estos fragmentos de cadena simple, lo que va conformando una serie de clúster, cada uno de ellos teniendo un puntaje de calidad, que permite descartar los que tienen puntajes bajos. Haciendo un lavado se puede separar la sonda de los fragmentos secuenciados en paralelo y así se forma una biblioteca de secuenciación (140) (Figura 6).

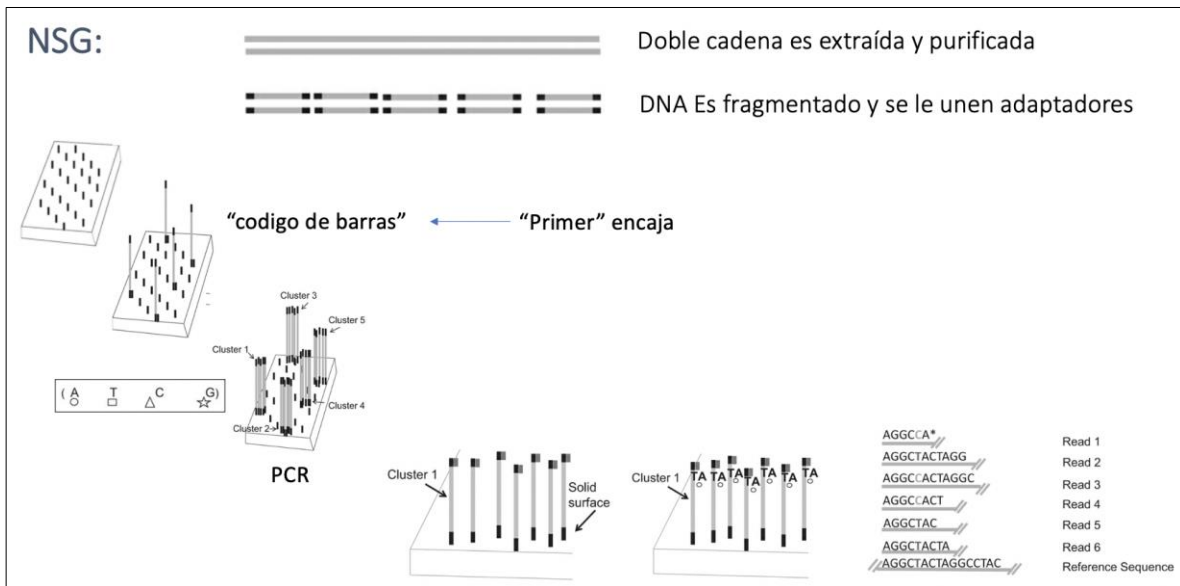


Figura 6. Esquema de los pasos requeridos para obtener la biblioteca por NGS. Para efectuar la NGS se extrae y purifica la doble cadena de ADN. Se fragmenta y se le unen adaptadores o sondas. Estos encajan mediante una especie de código de barras como una llave a una cerradura. Se efectúa con lo que se consiguen clúster, con los cuales se va a construir una especie de biblioteca que se organiza, en base a una matriz ya conocida y las variaciones en la alineación permiten detectar y analizar las diferentes alteraciones genómicas.

Fuente: elaboración propia.

2.2.2 Análisis de la prueba

Al tener la biblioteca de secuenciación se procede a hacer la alineación, como base se tiene una secuencia conocida, que podrían ser datos de la secuenciación del genoma humano, del Instituto Nacional para la Investigación del Genoma Humano (NHGRI) y del departamento de Energía (DOE) de EE.UU del que se tiene información de la secuencia de individuos sanos y variantes poblacionales; del Atlas del Genoma en Cáncer (TCGA); o un panel de genes seleccionado, en este caso F1-CDx que evalúa 324 genes relacionados con cáncer (158).

A medida que se van alineando computacionalmente los fragmentos producidos en paralelo por PCR a la secuencia seleccionada (matriz), se va conformando una estructura en la que podemos inferir la secuencia de los nuevos fragmentos alineados y en la que se podrán observar las diferentes variantes (159).

Una métrica importante cuando se buscan resultados de secuenciación es la cobertura media, que es el número promedio de lecturas que cubren cada ubicación dentro de la región de interés. La cobertura media deberá ser mayor cuando se está secuenciando todo el genoma, lo que aumenta el costo y la complejidad en la interpretación. Esta métrica es importante porque cuanto mayor sea su cobertura, con más confianza podrá realizar la detección de variantes (160).

La variante de alelo (VAF) es importante porque puede proporcionar pistas sobre el origen y la naturaleza de la variante, esta información incluye si la mutación es heredada o somática, si es homocigota o heterocigoto. La VAF también variará según el tejido tumoral analizado, determinado por grado de pureza, esto es, la concentración de tumor en relación al tejido vecino sano y su heterogeneidad (161).

La detección de variantes, no solo implica detectar determinada alteración, sino saber su ubicación: se puede detectar la variación de nucleótidos simples o único (SNIP por su sigla en inglés), en donde se observa que hay un nucleótido que no va acorde al que se debería esperar en relación al de base, por ejemplo si en la plantilla hay una G (guanina), toda la fila debería tener C (citosina) en donde es importante analizar la VAF la cual es la fracción del total de lecturas que contienen la variante. Se puede observar en la figura 8, cuatro de las diez lecturas tienen la variante G, entonces, la frecuencia alélica variante sería 0.4 o 40 por ciento (Figura 7) (142).

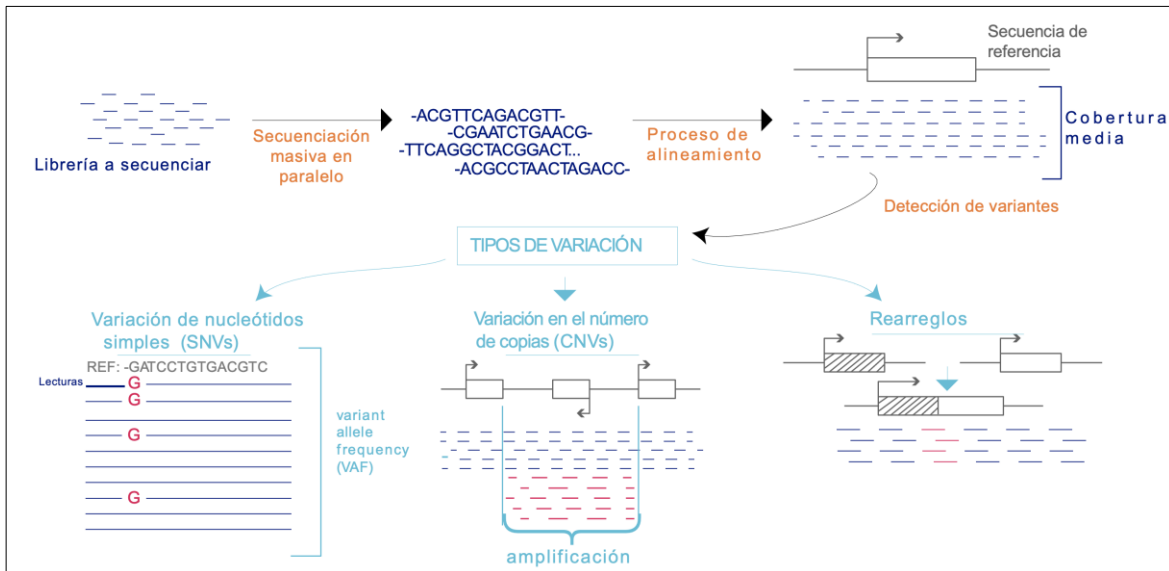


Figura 7. Análisis de secuenciación. La cobertura media es el número promedio de lecturas que cubren cada ubicación dentro de su región de interés. En relación con los tipos de variación, puede ser de variación de nucleótidos simples, en el número de copias o rearrreglos.

Fuente: modificado de HHMX Pro Genetics – Cáncer Genomics and Precisión Oncology.

Hay variaciones menos frecuentes que se pueden observar en las células cancerosas, como inserciones o deleciones, a las que a veces se hace referencia como “*indels*”, que implican la adición o eliminación de pequeñas cantidades de nucleótidos (162). La variación en el número de copias (VNC), consiste en encontrar en el alineamiento de la biblioteca de secuenciación un exceso (inserciones) o defectos (deleciones) de nucleótidos (163). En los reordenamientos o rearrreglos están incluidas, translocaciones e inversiones entre otras, que llevan a que se fusionen la totalidad o parte de dos genes. Para detectar este tipo de alteración, es importante buscar en la secuenciación de referencia desde inicio y final de cada parte del gen a fusionar. El informe final debe incluir, la relación del número de copias en cada cromosoma como puede observarse en la Figura 8.

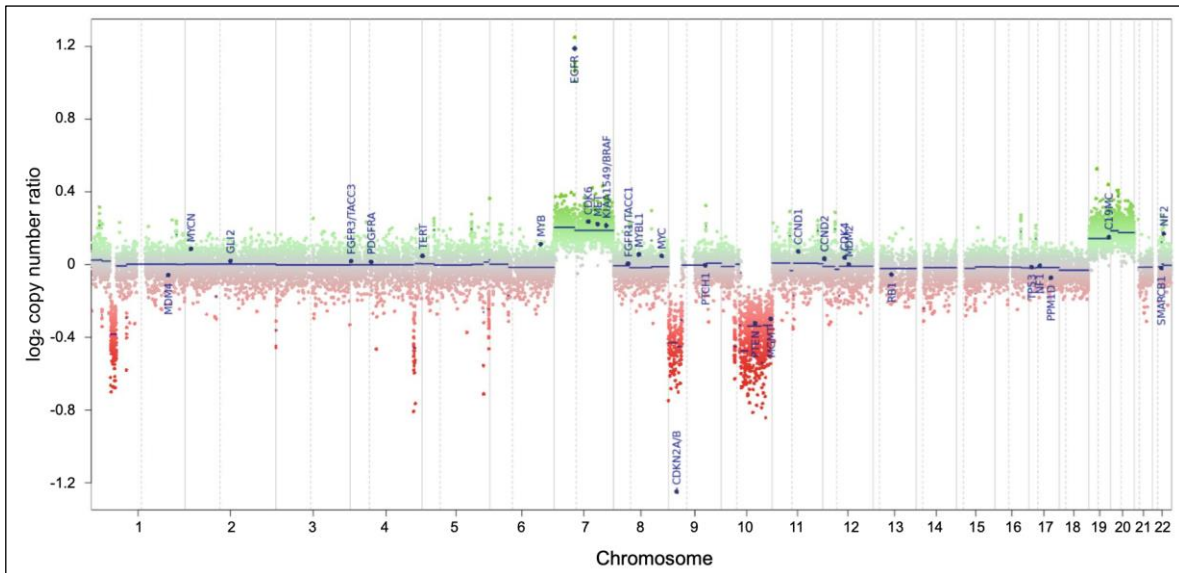


Figura 8. Ejemplo de amplificación. Gráfico típico de CNV de un GB^{WT-IDH}. Ganancia de los cromosomas trisomía 7, 19 y 20. Una amplificación de EGFR y una delección homocigótica de CDKN2A/B. Otras 27 regiones de genes están resaltadas de forma predeterminada con el nombre del gen.

Fuente: tomado de Practical implementation of ADN methylation and copy-number-based CNS tumor diagnostics: the Heidelberg experience. Acta Neuropathol. 2018.

2.2.2.1 Frecuencia de variante de alelos

Una forma de distinguir entre mutaciones de línea germinal y somáticas es comparar una muestra de tumor con una muestra tomada de tejido normal, porque las variantes de línea germinal se encontrarán en ambos lugares, mientras que las mutaciones somáticas se encontrarán exclusivamente en la muestra de tumor (154,164).

Sin embargo, no siempre es práctico, rentable ni ético analizar una muestra de tejido normal distante. En cambio, esta información en ocasiones se puede extrapolar a partir de una muestra de tumor utilizando el VAF, esto debido a que la mayoría de las muestras de tumores son una mezcla heterogénea de células cancerosas y tejido normal vecino (165).

Al analizar una variante de línea germinal heredada, se debe tener en cuenta que esta variante estará presente en todas las células normales y cancerosas del cuerpo. En una variante de línea germinal homocigótica se encontrarán copias del

genoma heredadas tanto de la madre como del padre, mientras que una variante heterocigota se encontrará en una sola copia (166). Esto significa que se debe observar una variante de línea germinal homocigótica en todas las lecturas de secuenciación de la muestra, mientras que se debe observar una variante de línea germinal heterocigótica en aproximadamente el 50% de las lecturas (Figura 9) (166).



Figura 9. Variante germinal hereditaria. Variante presente en todas las células del cuerpo, tanto normal como cancerosa. En una variante de línea germinal homocigótica, se observará la mutación en todas las lecturas de secuenciación de la muestra ($VAF=1$), mientras que en variante de línea germinal heterocigótica se observará en aproximadamente el 50% de las lecturas ($VAF=0.5$).

Fuente: copiado y modificado de HHMX Pro Genetics – Cáncer Genomics and Precisión Oncology.

Una mutación somática está presente solo en las células tumorales y no en las células normales, por lo que, en este caso, la VAF dependerá de la pureza y heterogeneidad de la muestra tumoral. La pureza del tumor es una estimación del porcentaje de células en la muestra de secuenciación que son células cancerosas; el resto de la muestra está conformado por células normales del tejido circundante y otras células del microambiente del tumor, como las células inmunitarias (167). En la figura 10 y 11, el área de la muestra utilizada para la secuenciación está rodeada por la línea discontinua, en este caso se ha estimado que la pureza es del 25%, lo que significa que el 25% de las células en esa área son células tumorales, mientras que el otro 75% son células normales u otras células no cancerosas; en

este caso, muchas de las células pequeñas teñidas de forma oscura son células inmunes (161).

Al analizar un ejemplo de una mutación somática clonal, se observará que está presente en todas las células cancerosas y en ninguna de las células normales de la muestra. Si es una variante homocigótica, la VAF será aproximadamente igual a la pureza del tumor, ya que la fracción de lecturas que contiene la variante sería igual a la fracción de células con la mutación. Entonces, si la pureza tumoral de la muestra fuera del 25%, la VAF sería igual a 0,25 o 25%. Si es heterocigoto, la VAF será aproximadamente la mitad de la pureza del tumor, ya que será la mitad de las lecturas que se originan en las células cancerosas; en este caso, sería 0,125 o 12,5% (Figura 10) (168).

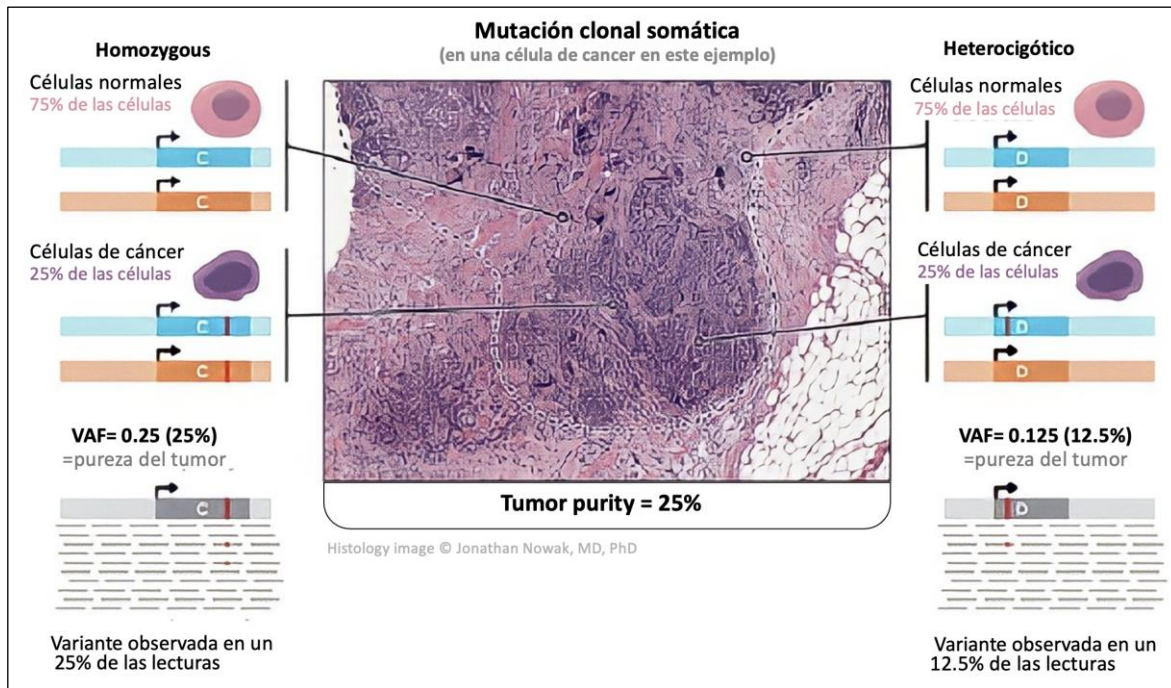


Figura 10. Mutación clonal somática. Variante presente solo en las células cancerosas. En una variante homocigótica, la VAF equivaldrá a la pureza del tumor. En una heterocigótica la VAF equivaldría a la mitad de la pureza del tumor.

Fuente: modificado de HHMX Pro Genetics – Cáncer Genomics and Precisión Oncology

La información obtenida de la VAF en general, puede ayudar a dilucidar el papel que desempeña una variante en el desarrollo del cáncer (169).

2.2.2.2 Interpretando la variación

Una vez que se tiene la lista de todas las mutaciones o variantes presentes en la muestra del tumor seleccionada del bloque de parafina o la biopsia líquida, lo siguiente que se debe hacer es determinar cuáles son biológicamente importantes ya que por el solo hecho de que las mutaciones estén presentes no significa que todas sean relevantes para la biología del cáncer (conductoras o “drivers”) dado que algunas de estas mutaciones pueden ser pasajeras (148).

Se tiene entonces una lista de mutaciones que están presentes en las células cancerosas en base al análisis de secuenciación y esta puede ir desde una sola mutación en algunos tumores cánceres infantiles como *BRAF*^{V600E} (170) hasta cientos de mutaciones en tumores malignos genéticamente complejos como el GB y a partir de ahí se debe interpretar la variación para determinar cuál de esas mutaciones podría ser importante. Dichas mutaciones pueden clasificarse como patógenas, benignas o puede tener un significado incierto o desconocido. Es importante afirmar que la categorización de una mutación no es estática, puede cambiar con el tiempo a medida que se acumula más información sobre esa mutación en particular (171).

En relación con las variantes patógenas, son variantes que se han observado en células cancerosas muchas veces antes y se sabe que impulsan el cáncer (“drivers”), para dar un ejemplo hay una variante patógena en el gen *BRAF* que es una mutación impulsora en un subconjunto de personas con melanoma y se caracteriza como *BRAF* c. 1799 T>A (V600E), y en la interpretación de este se puede observar en la Figura 11. Para resumir, la nomenclatura describe el cambio en el ADN y la secuencia de proteínas que causa la variante, en este caso de nucleótido simple, denominado SNIP (172).

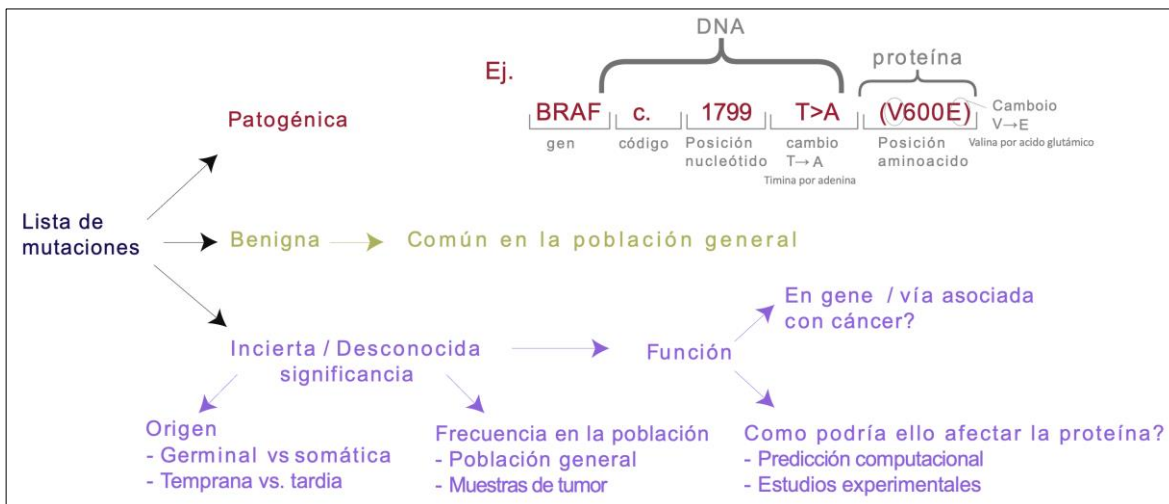


Figura 11. Interpretación de variación. Las variaciones pueden ser benignas, patogénicas o de significado incierto. Un ejemplo de una mutación patogénica en el gen BRAF, en donde cambia una timina por una adenina en la posición 1799, lo que se traduce en una proteína en la que cambia una valina por un ácido glutámico en la posición 600. Al encontrar una mutación de significado incierto o desconocido se debe evaluar si es germinal o somática, si es temprana o tardía, se debe buscar su frecuencia en la población y si esta reportada en cáncer y cuáles serían sus implicaciones.

Fuente: modificado de HHMX Pro Genetics – Cáncer Genomics and Precisión Oncology.

En relación con las variantes benignas, son mutaciones que se encuentran comúnmente en una población general sana. Esto indica que no causan cáncer y pueden descartarse como mutaciones impulsoras o *drivers* y como posibles dianas terapéuticas. Se pueden identificar comparando la lista de mutaciones con bases de datos que contienen información sobre la varianza común y las poblaciones humanas (173).

Las mutaciones de significado incierto o no se han visto comúnmente en una población general o no están fuertemente asociados con el cáncer. Para comprender el papel que estas mutaciones podrían estar jugando, lo primero que se debe hacer es observar la función del gen y cómo esta podría cambiar con la mutación. El siguiente paso es analizar si esta mutación y el cambio de función están asociada a alguna alteración descrita en la biología molecular del cáncer (148).

Para el análisis ómico, (neologismo derivado del alemán, que en biología molecular se utiliza como sufijo para referirse al estudio de la totalidad o del conjunto de algo) de las implicaciones de esta variante génica de significado incierto, que puede ser un hallazgo de “*novo*” o puede encontrarse en otro tipo de patologías, incluyendo tumores diferentes a los HGG y su nueva proteína posiblemente truncada se pueden utilizar (174):

- La predicción computacional que implica el uso de un algoritmo que intenta predecir si la variante alterará la estructura.
- La función de la proteína en función de su posición y el cambio de secuencia específico, mediante el denominado análisis in silico
- Utilizar estudios experimentales donde la variante puede introducirse en una línea celular humana o en un organismo modelo para medir el efecto que tiene en ese sistema

- Otra línea de evidencia que se puede considerar es la frecuencia poblacional o sea analizar cuál frecuente es la mutación en la población general, qué tan común es en muestras de tumores, etc (175).

Es de resaltar que una mutación de significado incierto podría ser interesante si se encuentra en otras muestras de tumores diferentes a los gliomas HGG, ya que esto podría ser una pista de que está desempeñando un papel importante (153). Otra consideración para analizar es el origen de la mutación, si es germinal o somática y si es homo o heterocigótica, ya sea mirando una muestra de la línea germinal o usando la frecuencia de variante de alelos (VAR) para tratar de extrapolar la información. Si es somática, observar en qué fracción de las células tumorales está presente con lo que se puede saber si podría ser una mutación temprana que está presente en todas las células cancerosas o una mutación tardía que está presente en solo una pequeña fracción ya que comprender los orígenes de la variación de esta manera puede dar una idea de su rol (161).

Encontrar una de estas mutaciones de importancia incierta o desconocida en una muestra de pacientes plantea un desafío para determinar su rol y un tratamiento posterior y a medida que se continua recopilando más datos sobre diferentes mutaciones en diferentes grupos de pacientes y diferentes tipos de cáncer, permitirá identificar más fácilmente mutaciones biológicamente importantes en los pacientes y centrarse en desarrollar tratamientos que contrarresten los efectos de esas mutaciones patógenas (Figura 11) (176).

2.2.2.3 Firma mutacional

Las firmas mutacionales son patrones de mutaciones que se pueden ver en todo o en cualquier parte del genoma que haya secuenciado y estas firmas mutacionales pueden proporcionar información sobre la génesis y desarrollo de la neoplasia o las posibles opciones de tratamiento para el paciente (177).

Se pueden obtener tres tipos de patrones: la carga mutacional tumoral (TMB) que es una medida de la densidad de mutaciones codificantes que se encuentran en el genoma de un tumor. Se calcula tomando el número de cambios de codificación, o las mutaciones que cambian la secuencia de aminoácidos de una proteína y la dividen por el número total de mega bases secuenciadas. Esto se puede calcular a partir de la secuenciación del genoma completo, del exoma o mediante el uso de un panel de genes del cáncer (178).

La segunda característica a considerar es si las mutaciones presentes en la muestra analizada se acomodan a un patrón identificado, lo cual puede dar una idea de si ciertos factores ambientales podrían haber desempeñado un papel en la causa de esas mutaciones (179).

La tercera característica está dada, por los defectos de reparación del ADN. Un tipo de defecto de reparación del ADN que se puede ver en algunos cánceres es una deficiencia de MMR, que ocurre cuando hay un defecto en la maquinaria celular que reconoce y repara mutaciones que alteran el emparejamiento de bases. La búsqueda de alteraciones en este sistema de reparación se efectúa a través de lo que se conoce como estabilidad de microsatélites, la cual, lo mismo que la TMB permite detectar los individuos responden bien a ciertas inmunoterapias (178).

Para su detección se busca en un lugar donde esta maquinaria de reparación es importante como es la estabilidad de los microsatélites, que son secuencias compuestas por una serie de repeticiones cortas de uno a diez pares de bases que se encuentran en todo el genoma humano, a menudo en regiones no codificantes (180).

Se resalta como la secuenciación se puede utilizar para determinar si en un tumor el estado de microsatélites es estable o inestable y deducir si es inestable si la maquinaria de reparación de desajustes es competente o no, lo cual a su vez tiene implicaciones en la selección del tratamiento (181). Sin embargo, dado que muchos microsatélites se encuentran en regiones sin codificación, es posible que no se incluyan en los paneles de genes a analizar (Figura 12).

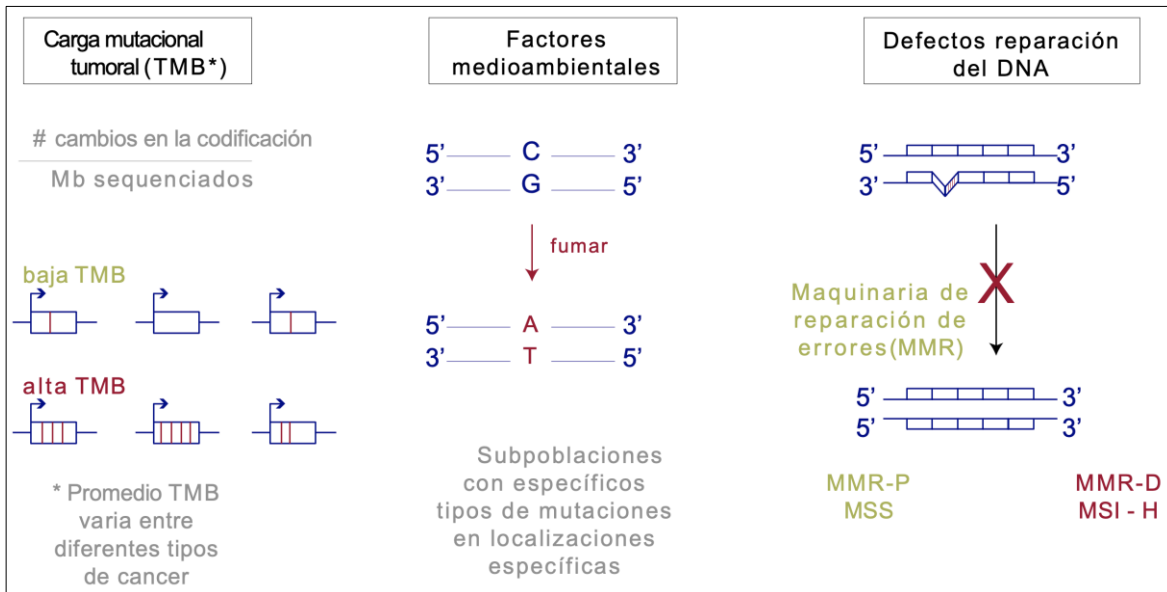


Figura 12. Firmas mutacionales. La TMB es una medida de la densidad de mutaciones codificantes que se encuentran en el genoma de un tumor. Se ha identificado relación entre ciertos factores micro-ambientales y ciertas mutaciones. Una maquinaria de reparación de ajustes competente (MMR-P) tendrá estabilidad microsatelital (MSS), y una deficiente (MMR-D) tendrá altos niveles de inestabilidad de microsatélites (MSI-H).

Fuente: modificado de HHMX Pro Genetics – Cáncer Genomics and Precisión Oncology.

Se concluye que identificar mutaciones en los genes es muy importante para comprender la genética del cáncer de un paciente en particular, pero alejar el zoom y observar el patrón de mutación en todo el genoma también puede brindar información importante sobre el tipo de cáncer que está observando, las características moleculares que lo están impulsando y potencialmente obtener información sobre si ciertos tratamientos podrían ser más o menos efectivos en el cáncer de esa persona en particular (182).

2.2.3 Perfilamiento genómico exhaustivo F1-CDx

F1-CDx es NGS que identifica alteraciones genómicas dentro de cientos de genes relacionados con cáncer (183). F1-CDx está diseñado para incluir genes que se sabe están alterados somáticamente en tumores sólidos humanos, que son objetivos blancos (target) validados para la terapia (ya sea aprobados o en ensayos clínicos), y/o que son impulsores (drivers) inequívocos de la oncogénesis (178).

F1-CDx analiza a 324 genes, incluyendo los intrones de 36 genes implicados en reordenamientos (184). En la tabla 3 está incluida la información reportada por F1-CDx, que cumple los requisitos de la Directiva Europea 98/79 EC para dispositivos médicos de diagnóstico in vitro (178). Analiza a 324 genes, incluyendo los intrones de 36 genes implicados en reordenamientos. Se da un puntaje a la pérdida de heterocigidad, se analiza el estado microsatelital (MS) y la carga mutacional tumoral (TMB) (Tabla 3).

Tabla 3. Análisis de F1-CDx

ABL1	ACVR1B	AKT1	AKT2	AKT3	ALK	ALOX12B	AMER1 (FAM123B)	APC
AR	ARAF	ARFRP1	ARID1A	ASXL1	ATM	ATR	ATRX	AURKA
AURKB	AXIN1	AXL	BAP1	BAR1	BCL2	BCL2L1	BCL2L2	BCL6
BCOR	BCORL1	BRAF	BRCA1	BRCA2	BRD4	BRIPI	BTG1	BTG2
BTK	C11orf30 (EMSY)	C17orf39 (GID4)	CALR	CARD11	CASP8	CBFB	CBL	CCND1
CCND2	CCND3	CCNE1	CD22	CD274 (PD-L1)	CD70	CD79A	CD79B	CDC73
CDH1	CDK12	CDK4	CDK6	CDK8	CDKN1A	CDKN1B	CDKN2A	CDKN2B
CDKN2C	CEBPA	CHEK1	CHEK2	CIC	CREBBP	CRKL	CSF1R	CSF3R
CTCF	CTNNA1	CTNNB1	CUL3	CUL4A	CXCR4	CYP17A1	DAXX	DDR1
DDR2	DIS3	DNMT3A	DOT1L	EED	EGFR	EP300	EPHA3	EPHB1
EPHB4	ERBB2	ERBB3	ERBB4	ERCC4	ERG	ERRF1	ESR1	EZH2
FAM46C	FANCA	FANCC	FANCG	FANCL	FAS	FBXW7	FGF10	FGF12
FGF14	FGF19	FGF23	FGF3	FGF4	FGF6	FGFR1	FGFR2	FGFR3
FGFR4	FH	FLCN	FLT1	FLT3	FOXL2	FUBP1	GABRA6	GATA3
GATA4	GATA6	GNA11	GNA13	GNAQ	GNAS	GRM3	GSK3B	H3F3A
HDAC1	HGF	HNF1A	HRAS	HSD3B1	ID3	IDH1	IDH2	IGF1R
IKBKE	IKZF1	INPP4B	IRF2	IRF4	IRS2	JAK1	JAK2	JAK3
JUN	KDMSA	KDM5C	KDM6A	KDR	KEAP1	KEL	KIT	KLHL6
KMT2A (MLL)	KMT2D (MLL2)	KRAS	LTK	LYN	MAF	MAP2K1 (MEK1)	MAP2K2 (MEK2)	MAP2K4
MAP3K1	MAP3K13	MAPK1	MCL1	MDM2	MDM4	MED12	MEF2B	MEN1
MERTK	MET	MITF	MKNK1	MLH1	MPL	MRE11A	MSH2	MSH3
MSH6	MST1R	MTAP	MTOR	MUTYH	MYC	MYCL (MYCL1)	MYCN	MYD88
NBN	NF1	NF2	NFE2L2	NFKB1A	NKX2-1	NOTCH1	NOTCH2	NOTCH3
NPM1	NRAS	NSD3 (WHSC1L1)	NT5C2	NTRK1	NTRK2	NTRK3	P2RY8	PALB2
PARK2	PARP1	PARP2	PARP3	PAKS	PBRM1	PDCD1 (PD-1)	PDCD1LG2 (PD-L2)	PDGFRA
PDGFRB	PDK1	PIK3C2B	PIK3C2G	PIK3CA	PIK3CB	PIK3R1	PIM1	PMS2
POLD1	POLE	PPARG	PPP2R2A	PPP2R2A	PRDM1	PRKARIA	PRKCI	PTCH1
PTEN	PTPN11	PTPRO	QKI	RAC1	RAD21	RAD51	RAD51B	RADS1C
RAD51D	RAD52	RAD54L	RAF1	RARA	RB1	RBM10	REL	RET
RICTOR	RNF43	ROS1	RPTOR	SDHA	SDHB	SDHC	SDHD	SETD2
SF3B1	SGK1	SMAD2	SMAD4	SMARCA4	SMARCB1	SMO	SNCAIP	SOC1
SOX2	SOX9	SPEN	SPOP	SRC	STAG2	STAT3	STK11	SUFU
SYK	TBX3	TEK	TET2	TGFBR2	TIPARP	TNFAIP3	TNFRSF14	TP53
TSC1	TSC2	TYRO3	U2AF1	VEGFA	VHL	WHSC1	WT1	XPO1
XRCC2	ZNF217	ZNF703						

ALK	BCL2	BCR	BRAF	BRCA1	BRCA2	CD74	EGFR	ETV4
ETV5	ETV6	EWSR1	EZR	FGFR1	FGFR2	FGFR3	KIT	KMT2A (MLL)
MSH2	MYB	MYC	NOTCH2	NTRK1	NTRK2	NUTM1	PDGFRA	RAF1
RARA	RET	ROS1	RSPO2	SDC4	SLC34A2	TERC*	TERT**	TMPRSS2

*TERC is an NCRNA
**Promoter region of TERT is interrogated

Loss of Heterozygosity (LOH) score
Microsatellite (MS) status
Tumor Mutational Burden (TMB)

Fuente: tomado de informe de F-1 CDx.

2.2.4 Genes involucrados en la clasificación de los HGG

Se denominan “moduladores” los elementos (mutación de gen, ARN mensajero, ARN no codificantes, proteína, radical, etc.) de las vías oncogénicas y metabólicas que se traducirán en determinado fenotipo (tipo de glioma, comportamiento, interacción con el microbioma y a distancia, etc.) (185).

Con el advenimiento de la NGS, se comenzaron a utilizar métodos para analizar varios moduladores simultáneamente y un ejemplo de ello es la evaluación de

muchos genes a la vez a través de los perfiles de expresión genómicos (genómica). Utilizando transcriptasa reversa, se analizan de igual manera ARN mensajeros y ARN no codificantes en lo que se denomina transcriptómica (185). Luego del uso de bisulfito, se pueden analizar las modificaciones en los promotores y las histonas a través de la epigenómica. Se evalúa la estructura y función proteica con la metabolómica y la interacción de todos ellos por medio de la interatómica (186).

Estas herramientas permiten analizar la génesis y el desarrollo de los HGG. La formación de los antes denominados GB secundarios a partir de los LGG ha permitido adquirir el conocimiento suficiente para considerar el proceso de la gliomagénesis como un proceso secuencial desde la célula precursora hasta el GB (187). En este proceso secuencial se ha reconocido que los cambios morfológicos de la transformación maligna son el reflejo de la adquisición paulatina de alteraciones genéticas y epigenéticas (54).

En la figura 13 se esquematiza el modelo basado en la clasificación de la OMS-4^{ed} del 2016, en donde en la célula glial precursora CGS", está implicada en la fase inicial del desarrollo de los gliomas. La mutación o no del gen de la IDH juega un papel fundamental ya que separa dos vías en el desarrollo: en la de los mutados para la IDH estarían el oligodendroglioma y el astrocitoma de bajo grado del que se originaría el antes denominado GB secundario y en la vía de la no mutación o silvestres de la IDH el GB primario (188).

Es así como si a la célula precursora, mutada para la IDH se suma la mutación de *ATRX* o la codeleción 1p/19q se tendría un oligodendroglioma de bajo grado. Pero si a la célula precursora, mutada para la IDH se suma la mutación *TP 53*, se tendría un astrocitoma de bajo grado (LGG) y a este último se adiciona la pérdida de *RB*, la pérdida de *CDKN2A* o la amplificación de *CDK4*, el paciente tendría un AA o grado III. Si a este se suman la amplificación de *EGFR*, la amplificación de *PDGFRA* y la pérdida de *PTEN*, el diagnóstico sería de un GB secundario (189).

Pero si la célula precursora se va sumando la amplificación o mutación de receptores de tirosina quinasa (TRK), la mutación de *NF1*, la mutación de *PI3K*, la pérdida o mutación *PTEN*, la mutación que lleve a pérdida de *TP53*, la pérdida de *CDKN2A*, la pérdida de *RB1* y la amplificación de *CDK4*, se tendría un GB secundario (190).

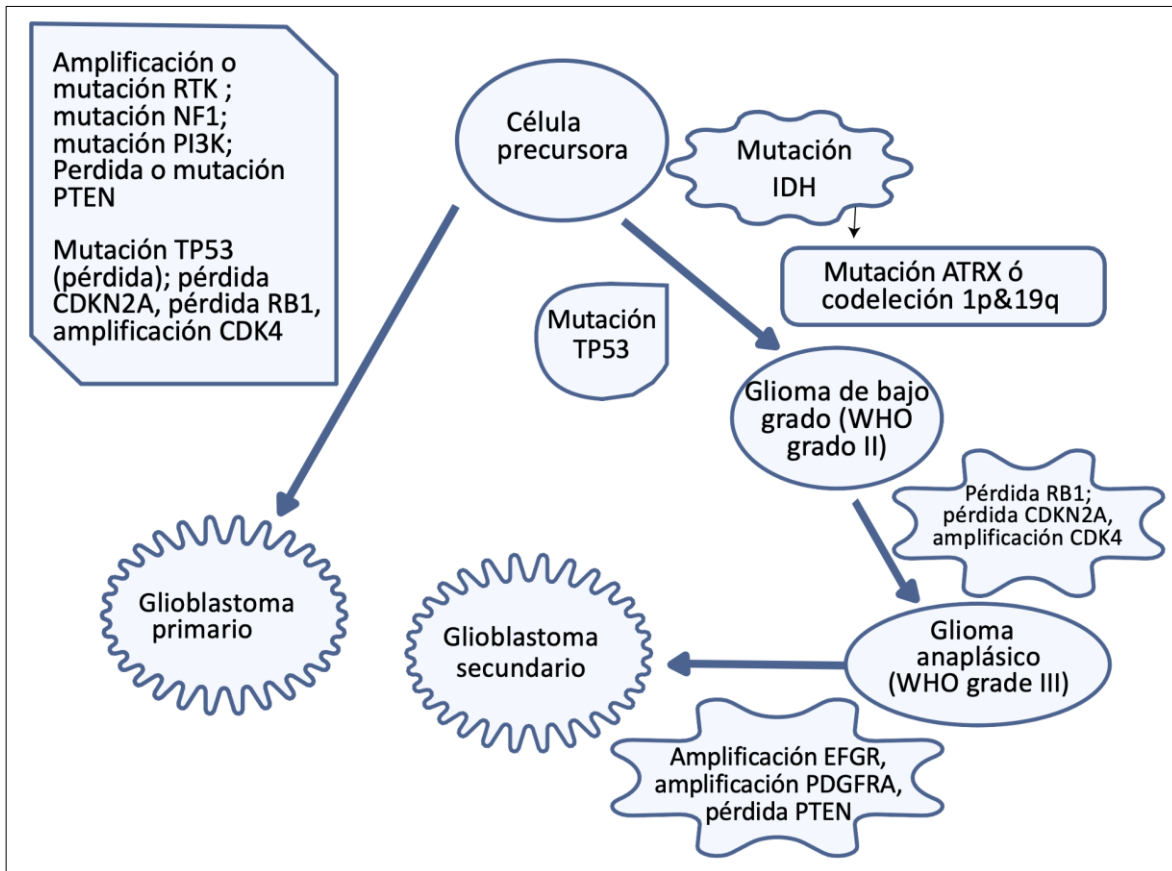


Figura 13. Gliomas de alto grado, según OMS-4^{ed}, 2016. El pilar en su clasificación es la mutación de la IDH en la célula precursora y en la cual, en los LGG, van pasado a glioma anaplásico y GB secundario. Las células precursoras que no tienen la mutación IDH, a medida que se suman otras alteraciones genómicas, van a dar origen a un GB primario.

Fuente: modificado de Kumaravel Somasundaram. *Advances in Biology and Treatment of Glioblastoma*. 2017.

2.2.4.1 Las mutaciones y VNC involucrados en la clasificación de los HGG

IDH: La enzima tiene tres isoformas que son esenciales en varios procesos metabólicos, tales como el ciclo de Krebs, el metabolismo de la glutamina, la lipogénesis y la regulación redox. La IDH1 está localizada en el citoplasma y los peroxisomas, mientras que las IDH2 y IDH3 están localizadas en la matriz mitocondrial (191).

Los sitios catalíticos de la IDH1 y IDH2 muestran afinidad por el sustrato isocitrato con NADP⁺ y un catión divalente, resultando en la formación de α -ketoglutarato

(α -kG). Las mutaciones más importantes en la génesis de gliomas están en los genes de la IDH1 e IDH2, la cuales tienden a localizarse en el residuo de arginina (R) que es crucial para el reconocimiento del isocitrato, esto es R132 para IDH1 y R140 o R172 para IDH2 (192).

La mutación sin sentido en el gen de la IDH1 se traduce en el reemplazo de la unión fuerte y con carga positiva de la arginina por aminoácidos con baja polaridad tales como histidina (H), lisina (K) o cisteína (C), lo cual impide la formación de uniones de hidrogeno con los sitios α -carboxil de isocitrato (192).

La enzima IDH mutante exhibe entonces una afinidad disminuida para isocitrato, así como una elevada preferencia por NADPH. Sin embargo, solo una copia del gen de la IDH esta mutada en los tumores, y en las células tumorales, que muestran mutaciones heterocigóticas de la IDH y se presume que las principales formas de dímeros de IDH son heterodímeros que contienen una versión de IDH1 no mutada y una versión con la mutación R132H. Como resultado, en las células mutadas para IDH, el componente silvestre del dímero se convierte a α -ketoglutarato (α -KG) para producir NADPH mientras la parte mutante del dímero exhibe una actividad neomórfica, convirtiendo el α -KG en una molécula antes no existente, la D-2 hidroxiglutarato (D-2-HG) en una manera dependiente de NADPH (192).

La establecida actividad de esta nueva enzima asociada con la mutación de la IDH ha mostrado tener efectos en el metabolismo celular y la oncogénesis (193). La disminución de α -KG podría afectar el nivel de la subunidad alfa del factor inducible por hipoxia (HIF-1 α) ya que el α -KG es necesario para que las proil-hidroxilasas (PHD) hidroxilen y promuevan la degradación de factor dependiente de hipoxia (HIF). La mutación de IDH está asociada a la hipermetilación de las islas CpG, lo cual, como se vio anteriormente, lleva al fenotipo G-CIMP. La actividad neomórfica de la IDH1 mutante resulta en una hipermetilación global del ADN y las histonas, ya que las demetilinasas son bloqueadas por el nuevo onco-metabolito D-2-KG (194).

Codelección 1p/19q: Resulta de una translocación no balanceada de un brazo simple del cromosoma 1p y 19q. La secuenciación de estas regiones identificó mutaciones en dos potenciales genes supresores: Elementos corriente arriba Far-(FUE)-proteína de unión-1 (*FUBP1*) en el brazo del cromosoma 1 y el gene homólogo de la *Drosophila capicúa* (*CIC*) en el brazo 19q (195).

FUP1: regula la expresión de *MYC*, y se cree que la mutación inactivante de *FUBP1* resulte en la activación de *MYC*, un conocido oncogén (196).

CIC: en *Drosophila* *CIC* codifica un factor de transcripción (CIC) regulado por la vía dependiente de receptor RTK. La activación de RTK a través de proteína quinasas asociadas a mitógeno (MAPK) lleva a la degradación de la proteína CIC y activación de los genes previamente suprimidos. *CIC* es altamente conservado y se piensa que en humanos se correlaciona su función de una forma similar (197).

Promotor de TERT: El mantenimiento de los telómeros es crítico para la célula cancerosa al prevenir la senescencia celular o muerte. Esto puede ocurrir por que se incrementen los niveles de telomerasa, una enzima que mantiene directamente los telómeros, o a través de un mecanismo independiente de la telomerasa, conocido como alargamiento alternativo de la telomerasa (ALT) (198). El ALT es visto en cánceres presagiando mutaciones en *ATRX* o dominio de proteína asociada a muerte (*DAXX*), mientras mutaciones en el promotor de *TERT* (Transcriptasa de telomerasa reversa) se traducen en un incremento en la expresión de la telomerasa. Mutaciones de *ATRX* y *TERT* son mutuamente excluyentes (199).

Ambas *ATRX* y mutaciones en el promotor de *TERT* se encuentran en gliomas. En tumores mutados para IDH, mutaciones en *ATRX* se traducen en tumores astrocitarios mientras que las mutaciones en el promotor de *TERT* son casi siempre vistas con la codeleción 1p/19q resultando en tumores oligodendrogiales. Mutaciones en el promotor de *TERT* son comúnmente vistas en GB^{WT-IDH}. La mutación del promotor de *TERT* solo tiene un valor pronóstico negativo en los pacientes con GB^{WT-IDH} ya que está asociado a un buen pronóstico en los pacientes con tumores mutados para IDH (200).

NOTCH1: aproximadamente 15% de los oligodendrogliomas poseen mutaciones en *este gen*, y menos comúnmente en otros genes involucrados en la vía NOTCH. La mutación *NOTCH1* se asoció con una más corta sobrevida (201). La activación de NOTCH podría estimular la señalización de β -catenina y NF κ B a través de la activación de AKT en células de glioma. Por lo tanto, la señalización de β -catenina y NF κ B estimuladas por la activación de NOTCH promueve sinérgicamente las propiedades migratorias e invasivas de las células de glioma (202). Esta se ha relacionado con la mutación en *PIK3CA* y la respuesta a fármacos (203).

ATRX: como se anotó anteriormente mutaciones de este gen se traducen en tumores astrocitarios. Alfa-Talasemia/síndrome retardo mental ligado al cromosoma X (ATRX) es una proteína remodeladora de cromatina cuya función principal es el depósito de la variante de histona H3.3. Las mutaciones de *ATRX* están ampliamente distribuidas en el glioma y se correlacionan con el desarrollo de alargamiento alternativo de los telómeros (ALT), pero también afectan otras funciones relacionadas con la regulación epigenética (204).

TP53: denominado el guardián del genoma, es un gen supresor de tumores localizado en el sitio cromosómico 17p13.1 y codifica para la proteína p53, un factor de transcripción implicado en la regulación de múltiples funciones celulares relacionadas con la biología del cáncer, como son la regularización de la proliferación celular, la reparación del ADN, la apoptosis y la diferenciación (205).

CDKN2A/B: está localizado en el sitio cromosómico 9p21, siendo un gen regulador del ciclo celular G1 negativo, ya que codifica las proteínas p16INK4a y 14ARF. La p16 es una proteína supresora de tumores que induce la detención del ciclo celular mediante la inhibición de los complejos de ciclina D-CDK4 y ciclina D-CDK6, lo que indica la fosforilación de la proteína Rb; mientras que p14ARF es una proteína que bloquea la degradación de p53 mediada por Mdm2 (206).

EGFR: también conocido como HER1 o ERBB1, es un RTK transmembrana de la familia ERBB. Esta es una familia de cuatro receptores (ERBB1-4 o HER1-4), siendo EGFR el mejor caracterizado. Al unirse a ligandos que incluyen: el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), la anfiregulina, la betacelulina, el EGF de unión a heparina (HB-EGF) y el epigén o epirregulina; el EGFR forma homodímeros o heterodímeros con otros miembros de la familia ERBB (207).

La dimerización de EGFR conduce a la trans-fosforilación (autofosforilación) de su cola C-terminal, que sirve como sitio de acoplamiento para las proteínas de señalización que contienen el dominio de homología SRC2 (SH2), incluida la proteína 2 unida al receptor de factor de crecimiento (GRB2), la proteína transformadora 1 que contiene el dominio de homología 2 de SRC (SH1) y proteínas transductores y activadoras de la transcripción (STAT). Estas proteínas de señalización regulan los procesos fisiológicos y patológicos de la vía que se dirige al núcleo (208).

Las mutaciones activadoras en el dominio quinasa de EGFR se detectan con frecuencia en el cáncer de pulmón de célula no pequeña (NSCCL) (209). Estas

mutaciones, L858R en el exón 21 y la delección en marco en el exón 19, son raras en GB. Por el contrario, en GB se encuentra con frecuencia un grupo separada de deleciones de *EGFR* y mutaciones puntuales. Las deleciones de *EGFR* en GB incluyen *EGFR* vI (eliminación N-terminal), vII (eliminación de los exones 14-15), vIII (eliminación de los exones 2-7) y vIV (eliminación de los exones 25-28), entre los cuales vII y vIII son oncogénicos (210).

VNC+7/-10: se conoce poco acerca de la relevancia de evaluar independientemente los brazos de los cromosomas 7 y 10, esto es, la ganancia de otro brazo en el cromosoma 7 y la pérdida de un brazo en el 10, lo cual se detectó por citogenética y posiblemente sea el resultado de errores en la división mitótica. Usando NGS se observó que mutación de *EGFR* (amplificado), del promotor de *TERT* más esta CNV pueden llevar al diagnóstico de GB^{WT-IDH}, aunque no se observe proliferación vascular ni necrosis (211).

2.3 Factor Pronostico

Se define como factor pronóstico toda medida obtenida del paciente a lo largo del tiempo, que tiene correlación con la probabilidad de recuperación o la probabilidad de recurrencia y por lo tanto con la supervivencia (212), pero que no permite sugerir determinado tipo de tratamiento oncológico. Para el estudio de los factores pronósticos, estos han sido divididos en varias categorías: clínicos, quirúrgicos, histológicos y terapéuticos además de los adicionados recientemente, como son los moleculares (213).

Se definen tres variables clínicas como factores pronósticos: la edad ya que pacientes diagnosticados con más de 70 años tienen un peor pronóstico que aquellos que son diagnosticados con menos de 40 (51), el antecedente de convulsiones que sugerirían que el GB viene de un LGG (antes denominado GB secundario) (34) y el estado funcional basados en la escala de KPS ya que pacientes con un índice de 50 (necesita ayuda importante y asistencia médica frecuente) o menor, tienen elevado riesgo de muerte durante los 6 meses siguientes (214). Este último parámetro va ligado a la necesidad o no de suministrar corticosteroides para sostener un estado funcional adecuado (7).

En relación con los factores pronósticos relacionados con la CX, el grado de resección quirúrgica se establece como factor pronóstico, ya que el porcentaje de citoreducción quirúrgica tiene un papel fundamental en el manejo clínico de los

pacientes con HGG. Una resección completa o casi completa de la tumoración (*debulking*) da lugar a un mejor pronóstico obteniéndose una supervivencia de 11,3 meses con una resección completa frente a 10,4 meses si es parcial o 6,6 meses si solo se practica una biopsia (215). Ello se ha corroborado demostrando que la mayor resección del área captante del medio de contraste gadolinio y no captante (216) en T1, se asocia con una más larga OS, especialmente en jóvenes (217). También existen estudios que demuestran que un tratamiento con RT postoperatoria incrementa la supervivencia de los pacientes con HGG (218).

Desde el punto de vista histológico y molecular los gliomas son tumores muy heterogéneos, por lo que resulta muy importante obtener una buena muestra quirúrgica para lograr una correcta clasificación histológica y por ende para tratar de hacer medicina personalizada (219) y puntual (113). La necrosis constituye el parámetro histológico más decisivo en la supervivencia de pacientes con glioma (220).

En el análisis histológico de la muestra obtenida, se pueden observar células que sugieren un tumor de estirpe oligodendroglial (195), sospecha que se corrobora si se encuentra mutación de IDH ((221) y codeleción 1p/19q (222), siendo este tipo de tumores los de mejor pronóstico de todos los que conforman la familia de los astrocitomas difusos del adulto. Si en la H-E se observan células en forma de estrella, propia de los astrocitomas y se documenta mutación de la IDH1, se tendrá un astrocitoma, de mejor pronóstico que el GB (195).

2.3.1 Biomarcadores Pronósticos

Tener metilado el promotor de la MGMT por PCR es un factor pronóstico benéfico, independiente del tratamiento; del estudio liderado por el Dr. Stupp en donde se incluyeron 573 pacientes, se tomó una muestra de 206 a quienes se les analizó por PCR la metilación del promotor de la MGMT, encontrando una diferencia significativa, independientemente de la asignación del tratamiento, en la supervivencia general entre los pacientes cuyos tumores tenían metilación del promotor de MGMT y aquellos cuyos tumores no la tenían ($P < 0,001$ por el logaritmo -prueba de rango). El cociente de riesgos instantáneos de muerte fue de 0,45 (Valor $p < 0,001$ IC 95%, 0,32 a 0,61) entre aquellos con metilación del promotor de MGMT, un resultado que corresponde a una disminución del 55 % en el riesgo de muerte en este subgrupo (7).

No es tan claro su valor pronóstico cuando se coteja el tener o no la metilación y si se suministra PS o solo RT ya que en el subgrupo de pacientes metilados que

reciben la PS disminuye el riesgo de muerte en un 49% frente a los que solo reciben RT y en los no metilados que reciben el PS disminuye en riesgo de muerte en un 31% frente a los que solo reciben RT (7).

Se han utilizado diferentes técnicas para la metilación del promotor de la MGMT con métodos elaborados como la metilación específica de PCR (MSP), pirosecuenciación, la plataforma EPIC BeadChip arrays, alta resolución Melt (HRM) o análisis de alta resolución de fusión, que compara curvas de fusión de las cadenas de ADN (223).

Otros estudios han identificado a factores de crecimiento y sus receptores como posibles factores pronósticos en gliomas, como es el caso de mutación del gen de *EGFR* (224), pero la heterogeneidad del tumor y su complejidad molecular ha limitado la aplicación práctica de estos biomarcadores (225).

Sin embargo, un pequeño grupo de individuos parecen tener una supervivencia más larga, denominados “respondedores excepcionales”, en lo que esta respuesta ha sido asociada, en parte, a la hipermetilación del promotor del gen de la MGMT. Estudios recientes apuntan a que en los respondedores excepcionales hay otros factores genéticos pronósticos, e instan a su búsqueda (226) para que sirvan para reorientar la fármaco-oncología hacia medicamentos emergentes u otras modalidades de tratamiento (219).

2.3.2 Biomarcadores Predictivos

Se definen como biomarcadores predictivos, los que pueden indicar cuál será la respuesta a determinada modalidad de tratamiento. Se sabe que el tener metilado el promotor de la MGMT es pronóstico y predictor independiente del tratamiento, por lo que a un paciente que tenga metilado el promotor se le puede afirmar que ya sea que reciba PS o solo RT va a tener mejores desenlaces que si no tuviese metilado el promotor, pero no se puede aseverar que una modalidad de tratamiento es mejor que la otra, aunque se sugiere el PS en los menores de 70 años con adecuado KPS (7).

En los que si tiene valor predictivo es en los mayores de 70 años, en los que se prefiere dar solo TMZ si tiene metilado el promotor de la MGMT o solo RT si no lo tienen metilado (227). Se ha evaluado el poder predictivo de otros biomarcadores como mutaciones SNV, microARNs y micronúcleos (18,19), pero la sensibilidad y especificidad encontradas, lo mismo que la dificultad en la técnica no ha permitido generalizarlos al uso clínico (111,228).

En los menores de 70 años el manejo de lección es el protocolo Stupp, con radio y quimioterapia con TMZ concomitante y adyuvante. Tratando de evitar efectos colaterales en una población altamente vulnerable como son este grupo de edad, generalmente se utiliza una de las dos modalidades de tratamiento, radioterapia o temozolamida. En los pacientes en los que tienen metilado el promotor de la MGMT se puede predecir que van a responder adecuadamente a la temozolomida, y en los que no lo tienen metilado y que produce la encima que revierte el efecto de la quimioterapia se puede predecir que les va ir mejor con la radioterapia (111,228).

2.4 Mecanismos de resistencia a la TMZ

Las estrategias actuales de manejo del cáncer no logran tratar adecuadamente todas las neoplasias malignas con QT, debido a factores restrictivos de dosis como la toxicidad sistémica y la resistencia a múltiples fármacos; lo cual, limita los beneficios terapéuticos, la calidad de vida y las tasas de remisión completa a largo plazo. La resistencia de las células cancerosas a los medicamentos contra el cáncer es una de las principales razones del fracaso de los tratamientos tradicionales oncológicos (57).

Los componentes celulares y la desregulación de las vías de señalización contribuyen a la resistencia a los medicamentos. Si se modulan, tales perturbaciones pueden restaurar la respuesta al fármaco y su eficacia. Si bien los HGG de muchos pacientes responden inicialmente a la QT, solo en un 10 a 15% de los pacientes denominados respondedores excepcionales tienen largas sobrevividas (120). En la mayoría, ningún régimen farmacológico actual puede superar la inevitable recurrencia del tumor, cuyo sello distintivo es la quimio-resistencia (21).

Una táctica novedosa para combatir esta enfermedad mortal es atacar sus mecanismos de quimio-resistencia. Muchos de estos mecanismos pueden ser concurrentes. El conocimiento de la plétora de vías celulares y mecanismos involucrados continúa brindando valiosos conocimientos biológicos y terapéuticos sobre las estrategias de resistencia de los HGG. En la medida que se van detectando estos obstáculos, se ha tratado a partir de estudios mecanicistas y preclínicos de buscar la clave para el tratamiento de GB, que el tumor más frecuente, complejo y maligno de los HGG. Se han intentado tratar con terapias multimodales que atacan el cáncer de manera sinérgica en varios frentes, con

resultados infructuosos, por lo que el esfuerzo también se ha enfocado en optimizar la TMZ, que cambió el manejo de los HGG (117).

La resistencia innata a la terapia se caracteriza por la presencia de células gliales que poseen ciertos mecanismos genéticos y/o epigenéticos para superar las acciones de la quimio-radiación de la PS, lo que conduce a que continúe el crecimiento de células tumorales a pesar del tratamiento. La resistencia adquirida implica alteraciones fenotípicas de células GB vírgenes para convertirse en tumores más agresivos después de la quimio-radiación. Esta resistencia surge con el tiempo, posiblemente debido a inestabilidad genética estimulada, mutaciones genéticas acumuladas y/o alteraciones epigenéticas de las células GB después del tratamiento. Desafortunadamente, esto disminuye la eficacia de rondas posteriores de QT para tumores recurrentes después del control inicial de la enfermedad (229).

El gran desafío en el manejo de pacientes con HGG será ampliar estos conceptos, herramientas, esfuerzos y direcciones. Por ejemplo, esto requerirá nuevas estrategias en el diseño de futuras terapias que sensibilicen mejor a los GB a TMZ y que se dirijan a las células resistentes. En medio de la heterogeneidad tumoral, es esencial identificar y caracterizar qué tipos de células de GB pueden evadir las terapias y convertirse en células cancerosas iniciadoras de recurrencia para que puedan ser atacadas adecuadamente. Un mayor conocimiento de la evolución genética de las poblaciones de células GB después de la terapia, y la capacidad de las células GB para adoptar características similares a las células madre, también nos proporcionará nuevos conocimientos invaluable para abordar este cáncer recalcitrante (12).

Además, en esta era de medicina de precisión, será necesario desarrollar muchas más técnicas moleculares que permitan la toma de decisiones del tumor único de cada paciente, con la esperanza de que este enfoque personalizado genere información útil para evitar la quimio-resistencia. Cada mecanismo de resistencia presenta desafíos formidables para lograr un tratamiento efectivo de GB y a medida que adquirimos más conocimientos para superar estas dificultades, los futuros medicamentos mejorados serán más prometedores para los pacientes con HGG (230).

2.4.1 Alteraciones moleculares en GB resistente a la TMZ

Se ha documentado resistencia a la TMZ (TMZ-R) ya sea por vía natural (primaria) o por vía co-terapéutica (inducida). En ello se han identificado tres mecanismos primordiales de reparación que conducen a TMZ-R: (a) incremento en los niveles intracelulares de MGMT; (b) deficiencia en la respuesta de reparación de malos apareamientos (vía MMR); (c) un muy eficiente mecanismo en la vía reparación por escisión de bases (BER); y en teoría también se ha postulado la sobre activación de la vía de la poly (ADP)-ribosa polimerasa (PARP). Pero la mayor evidencia alrededor de la resistencia primaria a la TMZ gira alrededor del incremento de la MGMT, y en menor grado a deficiencias en la vía MMR (231).

El principal mecanismo de acción de TMZ se basa en la formación de O⁶-metilguanina (O⁶-mG), N⁷-metilguanina (N⁷-mG) y N³-metiladenina (N³-mA) durante la replicación del ADN mediante el transporte de un grupo metilo (CH₃) en el O⁶ y N⁷ de guanina, y N³ de adenina. La metil-guanina o la metil-adenina causan un par de bases no coincidentes, que dan como resultado roturas de ADN y finalmente inducen la detención del ciclo celular en G2/M y la muerte de las células cancerosas (185).

La mayoría de las bases de ADN alteradas mediadas por TMZ pueden repararse mediante la vía BER. APNG inicia la BER eliminando las lesiones de la base de N³-mA y N⁷-mG inducidas por TMZ, dejando sitios básicos (sitios AP) en el ADN para su posterior procesamiento por parte de la BER (232). Otro mecanismo es el apareamiento equivocado de la O⁶-mG con T y la corrección de solo esta última cadena por MMR, acumulándose las cadenas que tienen la guanina metilada, lo que activa la vía apoptótica (12).

Además de la alquilación del ADN, la TMZ puede afectar los cambios fenotípicos de las células GB a través de eventos de vías de señalización genómica y molecular. Por lo tanto, la TMZ-R en GB no está asociada con una sola vía o molécula de señal, sino con vías o redes de señalización complejas (231).

2.4.1.1 Eventos moleculares en células de GB después de TMZ

Al analizar los efectos moleculares en células de GB después del tratamiento con TMZ, se debe recordar que el GB es un cáncer humano complejo debido a múltiples mutaciones genéticas y alteraciones en la expresión de proteínas que dan como resultado la vía de señalización celular alterada para funciones celulares clave como la proliferación celular, división, metabolismo, migración/metástasis/invasión y angiogénesis (233).

El análisis del TCGA mostró mutación del RTK 2 Erb-B2, (*ERBB2*), del gen de la neurofibromatosis tipo 1 (*NF1*), de la proteína tumoral p53 (*TP53*), del fosfoinositido-3-quinasa, subunidad reguladora 1 (*PIK3R1*), alteración de la metilación del promotor de *MGMT* y deficiencia de MMR en GB. El análisis del genoma TCGA también identificó alteraciones genéticas frecuentes en cuatro vías de señalización críticas como RTK/RAS/PI3K; Ras-MAPK, p53 y vía de señalización RB. Además, se encontró que la activación anormal de RTK en los GB, habían estimulado constitutivamente el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) en Tirosina705 a través de la activación o sobreexpresión de factores de transcripción al final de la vía de señalización (234). Sin embargo, el impacto de la activación de STAT3 en una posición diferente a tirosina705 como fosfo-tirosina705, o fosfoserina 727, puede variar (235).

El sello distintivo de los eventos moleculares y las vías de señalización de los GB pueden verse afectados por el tratamiento con TMZ. Los GB tratados con TMZ inducen una hipermutación en el ADN y un subconjunto de GB recurre con una mayor tasa de mutación (236). Además de las mutaciones genéticas, la TMZ puede afectar la expresión de moléculas de múltiples vías de señalización en GB. Por ejemplo, el análisis del transcriptoma en células GB U87-MG humanas tratadas con TMZ demostró un enriquecimiento significativo de la vía de señalización Wnt/ α -catenina, independientemente de la vía ATM/Chk2 y otras vías en las células tratadas con TMZ. El estudio también encontró que el tratamiento con inhibidor de PI3K, el LY294002 reprimió la activación de Akt y abolió la inducción mediada por TMZ de la vía Wnt/ α -catenina en células U87-MG tratadas con TMZ (237).

La TMZ puede afectar la expresión de factores de crecimiento y moléculas de miARN en GB. Por ejemplo, el factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF) se reguló significativamente en las líneas celulares de GBM U87-MG y U251 humanas tratadas con TMZ (ambas células se conocen como líneas celulares TMZ-S (TMZ-S) a través de la adquisición de propiedades similares a las de células CGS de glioma y la interferencia de CD44 (238). La regulación al alza de CTGF inducida por TMZ depende del factor de crecimiento tisular- α (TGF- α) y está regulada por la activación de TGF- α 1 a través de la señalización de Smad y ERK1/2. La TMZ regula miR-524-5p en las células de GB U87-MG, U251 y redujo significativamente la viabilidad de estas (239).

La TMZ puede afectar la expresión de numerosas proteínas de GB. Por ejemplo, el tratamiento con TMZ aumentó la expresión de la matriz metaloproteinas-14

(MMP14), enzima de degradación de la matriz extracelular, especialmente en células madre de glioma (GSC), mas no en células en diferenciación, en células GB TMZ-S (U87-MG, U251) y en xenoinjerto derivado del paciente (PDX) en comparación con las células de control (240).

La TMZ también altera el metabolismo en GB. En el análisis metabólico, la histidina, la fosforilcolina y la colina aumentaron en las células U373 tratadas con TMZ en comparación con las células tratadas con vehículo (241).

2.4.1.2 Eventos moleculares en células de GB TMZ-R (innata), después de TMZ

Las células de GB con resistencia innata a la TMZ pueden tener diferentes vías de transcriptoma y señalización que las células GB sensibles (TMZ-S). Más del 50 % de los pacientes con GB primario no responden a TMZ en el tratamiento inicial; este fenómeno se denomina TMZ-R innata. La resistencia innata a los medicamentos se debe a múltiples razones, como las características heterogéneas del tumor, las células GSC, los mecanismos intrínsecos de resistencia a los medicamentos, la plasticidad epigenética de GB y la penetración deficiente de los agentes terapéuticos en la BHE humana (21).

Como ocurre en otros tumores resistentes a fármacos, la resistencia innata a TMZ puede ocurrir por características heterogéneas intertumoraes y/o intratumorales en los GB (242). La existencia de GSC en GB también contribuye a la resistencia innata a TMZ. Además, la resistencia innata a TMZ puede ocurrir a través de sus características funcionales moleculares inherentes, como no responder desde las primeras dosis de TMZ o la interrupción temprana de la acción de TMZ en las células GB. La mala penetración de los agentes terapéuticos en la BHE puede causar una resistencia innata a la TMZ; sin embargo, TMZ tiene buena permeabilidad para BHE. Por lo tanto, la resistencia innata de TMZ no se debe a la permeabilidad de BHE sino a otras razones, como el microambiente hipóxico (123).

La TMZ sensibiliza las áreas límite de los GB, dejando el ambiente hipóxico en el área central de las células del GB sin una respuesta a TMZ debido a la regulación al alza de miR-26a mediada por el factor dependiente de hipoxia-1 (HIF-1). Este eje HIF-1/miR-26a previene la disfunción de Bax y Bad en las mitocondrias en GB y permite la progresión de GB (243). Un informe identificó que la peroxidación de lípidos también juega un papel importante en la TMZ-R en GB (244). De las múltiples líneas celulares de GB humanas TMZ-R, la T98G es la más resistente,

pero no representa la heterogeneidad del GB, por lo que se generaron líneas de xenoinjerto derivado de pacientes (PDX) TMZ-R a partir de tejidos tumorales de GB humanos (245).

Los eventos moleculares de GB/PDX innatos de TMZ-R:

Vía Akt/mTOR o EGFR/MAPK/STAT o JAK/STAT: Las GSC de GB y varias líneas celulares de GB establecidas (p. ej., T98G) se conocen como células TMZ-R innatas. T98G es una línea celular de GB humano generada a partir de tejidos tumorales de GB caucásicos masculinos. Las muestras de pacientes con GB mostraron que la expresión elevada de la activación de STAT3 (p-STAT-3) se correlacionó con la resistencia a la terapia de alquilación, como el tratamiento con TMZ (246). El estudio sugiere que las vías JAK y/o EGFR/MAPK asociadas con STAT pueden estar involucradas en la resistencia innata a TMZ. Las células GB TMZ-R, especialmente las GSC centrales, tienen una alta expresión de HIF-1 y MGMT (247). Estos datos sugieren que HIF-1 vinculado a Akt/mTOR puede estar involucrado en la resistencia innata a TMZ. Aunque hay varios estudios sobre el papel de la vía EGFR/STAT3 y ERK/HIF-1, las formas en que p-STAT-3 y HIF-1 influyen en la expresión de MGMT siguen sin estar claras (12).

Vía Hedgehog: la activación de la señalización hedgehog/Gli1 condujo a una mayor expresión de MGMT y aumentó la resistencia al tratamiento con TMZ en tejidos GB primarios (248).

Vía de señalización de Wnt/ α -catenina: existe una correlación significativa entre la expresión de MGMT y la señalización de Wnt/ α -catenina en cánceres como el carcinoma de colon (SW480) y GB (T98G) (249). Por ejemplo, el estudio de horquilla corta o ARN de horquilla pequeña (shARN) de α -catenina demostró que Wnt/ α -catenina regulaba la expresión de MGMT en células de carcinoma de colon LS1747. Estos datos sugieren que Wnt/ α -catenina puede estar asociada con la TMZ-R en GB (250).

Reparación del ADN y enzimas de respuesta al daño del ADN: MGMT se sobre expresa en un alto porcentaje de GB innatos TMZ-R. Además, la pérdida de MMR o el estado de mutación de p53 se asocia con resistencia innata a TMZ en GB (251). MGMT es una enzima reparadora de ADN para ADN dañado por TMZ. Por lo tanto, el aumento de la expresión de MGMT es un mecanismo de TMZ-R innato y adquirido bien conocido. Cuando el nivel de expresión de MGMT es alto en GB, las células superan la muerte celular mediada por TMZ y dan como resultado resistencia al tratamiento (21).

En general, alrededor del 60% de los tumores del SNC humanos expresan una MGMT significativamente más alta que la del cerebro normal (252). Por lo tanto, muchos tumores del SNC que expresan MGMT pueden tener la posibilidad de ser TMZ-R. El efecto de TMZ en las GSC de GB es controvertido. Se ha informado

que TMZ puede ser citotóxico en las GSC de GB de manera dependiente de la dosis y el tiempo (253); sin embargo, está claro que las GSC de GB hipóxicas e inmaduras son TMZ-R in vitro debido a la sobreexpresión de MGMT, el mecanismo de TMZ-R más conocido en GB. Aunque el alto nivel de expresión de MGMT es un mecanismo importante de TMZ-R en GB, algunos GB deficientes en MGMT mostraron TMZ-R (254).

El análisis de la base de datos de GB de TCGA identificó que la expresión de la dineína citoplasmática 2 cadena pesada 1 (DYNC2H1), también llamada DHC2, se correlaciona con una corta SLP en pacientes con GB recién diagnosticado y GB recurrente (que no recibieron tratamiento con TMZ) con metilación del promotor de MGMT (254). La expresión de ARN de DYNC2H1 se correlacionó negativamente con la expresión de MGMT. El mecanismo de superación para TMZ en GB deficientes en MGMT es a través de la interacción entre DHC2 con la proteína complementaria del grupo C del xeroderma pigmentoso (XPC) y el homólogo 5 de la proteína cromobox (CBX5) y por la regulación de su localización nuclear. XPC y CBX5 median en la reparación del daño del ADN inducido por la TMZ en GB deficientes en MGMT (254).

Debido a la acción de TMZ sobre la metilación del ADN, el adecuado funcionamiento en la vía BER y un defecto en MMR del ADN contribuyen a la resistencia innata a TMZ en GB. Las proteínas MMR son enzimas nucleares que intervienen en la reparación del desajuste base-base que se produce durante la replicación del ADN. Hay múltiples enzimas/vías de reparación del ADN relacionadas con diferentes tipos de daños en el ADN. La resistencia innata a TMZ en GB es por deficiencia de MMR a través del desarrollo de mutaciones en genes MMR críticos (p. ej., MSH2, MSH6, MLH1, PMS2) (255).

Ligando y receptor: el nivel de expresión de los ligandos y sus receptores se correlacionó con la respuesta a la TMZ. Por ejemplo, la amplificación y las mutaciones del EGFR se encuentran en el 40 % de los pacientes con GB primario. Las células U87-MG con expresión de EGFRvIII son más sensibles que las células tumorales cuyo EGFR no está mutado al tratamiento con TMZ solo y TMZ en combinación con cetuximab (256).

Las GSC tienden a mostrar una mayor expresión de la proteína miembro D del grupo 2 de asesinos naturales (NKG2DL), un ligando para NKG2D, en comparación con las células tumorales diferenciadas, y dan como resultado una resistencia a la terapia con TMZ (257). NKG2D es un sensor molecular de células estresadas y un potente activador del sistema inmunológico. Las células T98G TMZ-R innata tenían NKG2DL significativamente más alto en comparación con las células U251 TMZ-S (257). Estos resultados indican que NKG2DL puede estar involucrado en la TMZ-R (257).

Metabolismo: el nivel de expresión de los genes del metabolismo se correlaciona con la respuesta de TMZ. Por ejemplo, el nivel de expresión de la familia de

aldehído deshidrogenasa 1, miembro A3 (ALDH1A3), que participa en el metabolismo del alcohol y la peroxidación lipídica, se correlacionó con la TMZ-R en células GB, GB recurrentes y muestras de tumor GB primario (244). Por lo tanto, las células con ALDH1A3 inactivado “*knockout*” fueron más TMZ-S en comparación con las células de tipo salvaje (258).

miARN y ARN no codificante (lncARN): un miARN es una pequeña molécula de ARN no codificante que funciona en el silenciamiento del ARN y la regulación postranscripcional de la expresión génica. El nivel de expresión de algunos miARN está asociado con la resistencia TMZ innata y adquirida. Por ejemplo, la expresión de miARN-21 oncogénico, pero no del supresor de tumores miARN-16, aumentó en TMZ y neuro esferas tratadas con radiación en comparación con las células adheridas (259).

En el estudio de muestras del anteriormente denominado GB primario, cuatro miARN (miR-423-5p, miR-938, miR-1280, miR-1238) mostraron sobreexpresión en muestras de pacientes con GB primario TMZ-R en comparación con muestras TMZ-S (260). Mientras tanto, tres miARN (miR-93, miR-151-3p, let-7i) tenían una expresión disminuida en muestras de pacientes con GB primario TMZ-R en comparación con muestras TMZ-S (260).

El análisis comparativo de qPCR entre muestras clínicas TMZ-S y muestras clínicas TMZ-R mostró una expresión significativamente mayor del lncARN del gen 15 del hospedador de ARN nucleolar pequeño (SNHG15) y otros genes (Sox-2, β -catenina, EGFR y CDK6) en células PDX TMZ-R (261). La sobreexpresión de SNHG15 inhibió el supresor de tumores miR-627-5p y da como resultado la activación de CDK6 (261).

Factor de transcripción: varios factores de transcripción, como STAT3, están alterados en los GB innatos TMZ-R. La proteína STAT3 es un mediador oncogénico al final de la vía de señalización de la vía JAK/STAT. La activación de STAT3 mediada por EGFR se encuentra en células GB LN229 TMZ-R innatas (234).

Genes y proteínas: debido al papel clave del daño del ADN inducido por TMZ en la TMZ-R, una molécula que influye en la expresión de los genes MGMT, BER o MMR está involucrada en la resistencia innata a TMZ. Por ejemplo, la proteína de unión a retinoblastoma 4 (RBBP4), que interactúa con CBP/p300 para formar un complejo modificador de la cromatina y se une al promotor de MGMT y otros genes, está asociado con la TMZ-R en las células GB, de GB derivados de pacientes y PDX (262).

Se conocen varias proteínas involucradas en la resistencia innata a TMZ en GB, ya sea por expresión de proteína alterada o forma mutante de proteína. Por ejemplo, las células T98G TMZ-R innatas tienen una expresión más alta de un transportador de membrana plasmática Na⁺/K⁺-ATPasa que las células TMZ-S y

los astrocitos humanos normales (263). El aumento de CD44, una glicoproteína de la superficie celular está involucrado en la TMZ-R en las GSC. CD44 es un marcador de GSC (264).

CD133 es una glicoproteína y un antígeno de superficie celular como marcador para el marcador de células madre cancerosas GB. Las células positivas para CD133 expresan niveles más altos de ARNm de MGMT y son significativamente más resistentes a los agentes quimioterapéuticos, incluido TMZ, que las células negativas para CD133 (265).

La TMZ-R en los GB depende del estado de p53 porque las células de GB portadoras de p53 funcionales responden al daño del ADN y conducen a la sensibilidad a TMZ. Sin embargo, las células GB (SWB39, SWB77) con p53 mutante y una respuesta lenta del ciclo celular al daño del ADN mostraron una resistencia innata a la TMZ (245). La resistencia innata a TMZ no se debe a un solo gen mutación y se informó que la mutación del gen HFE (uno de los genes reguladores homeostáticos del hierro) en células de glioma TMZ-R (266). Las GSC tenían sobreexpresión y secreción de la proteína 4 similar a la angiopoyetina (ANGPTL4). La sobreexpresión del enriquecimiento de GSC inducido por ANGPTL4 da como resultado una TMZ-R en GB a través de la fosforilación de 4E-BP1 mediada por fosforilación de EGFR que se requería para el enriquecimiento de GSC inducido por ANGPTL4 (Figura 15) (267).

2.4.1.3 Eventos moleculares en células de GB TMZ-R (adquirida), después de TMZ

Se considera que las células de GB presentan una resistencia adquirida a la TMZ: cuando las células derivadas de pacientes de GB recurrentes no responden a TMZ o las células GB adquieren TMZ-R por exposición continua a TMZ a la misma concentración o su aumento gradual durante varias semanas o meses. La resistencia adquirida a TMZ puede ocurrir por la plasticidad epigenética de los GB ya que tienen una capacidad de adaptación a la terapia mediante la regulación en la transcripción o traducción y posterior a estas (268).

Los eventos moleculares de GB adquiridos de resistencia a TMZ

Vía EGFR/JNK: Las células de GB con resistencia adquirida a TMZ (U87-aR, T98G-aR) activan EGFR y el eje JNK-ERK1/2-AP-1 para inducir Cx43, que está involucrada en la comunicación intercelular de uniones comunicantes entre las células de GB con resistencia adquirida a TMZ (269). Además, se encontró activación (mayor fosforilación de JNK y mayor activación de su señalización aguas abajo) de la vía de señalización de JNK (quinasa terminal c-Jun) en células

GB TMZ-R adquirida (U343-aR) en comparación con las células no resistentes (270).

Vía Hedgehog: PTCH1, el receptor de la vía Sonic Hedgehog (SHH) y el ARNm aumentaron significativamente en las células de GB con resistencia a la TMZ (U87-aR, T98G-aR) (271). Estos resultados sugieren que TMZ podría inducir la regulación postranscripcional de Patched 1 (PTCH1) en células GB con resistencia adquirida a la TMZ. El estudio identificó miR-9 como el objetivo de PTCH1 en células GB TMZ-R adquirida con activación concomitante de la señalización de SHH. miR-9 aumentó en los tejidos de pacientes con GB y en células de GB de un paciente con GB recurrente, pero no de un paciente sin tratamiento previo. Estos datos sugieren que miR-9 se dirige a PTCH1 a través de un método independiente de SHH en células GB para resistencia a TMZ (271).

Vía de NF- κ B: La regulación al alza de la vía oncogén NF- κ B se asocia con la resistencia adquirida a TMZ en las células de GB. Por ejemplo, el factor nuclear I A (NFIA) contribuyó a la resistencia TMZ adquirida en células GB (U87-aR y U251-aR) (272). Además, la fosforilación de NF- κ B p65 en la serina 536 indujo resistencia a TMZ en células de GB U87-aR y U251-aR (272).

Un potente inhibidor de la vía de señalización de NF- κ B, la proteína 3 inducida por el factor de necrosis tumoral alfa (TNFAIP3) y el miembro de la familia I κ B inhibidor de NF- κ B, (NFKBIA), se sub-expresaron significativamente en células GB PDX TMZ-R adquirida al agente alquilante O⁶ (LX-aR, ME-aR) (273). La expresión de la transcripción de TNFAIP3 se correlacionó inversamente con el estado de activación de NF- κ B en las células GBM PDX adquiridas resistentes al agente alquilante O⁶ (273).

Vía PI3K/Akt o Ras en la resistencia adquirida a TMZ: aumento de la expresión de proteínas relacionadas con el citoesqueleto de actina, la adhesión focal y el fagosoma; y la vía de señalización de PI3K-AKT se identificaron mediante análisis proteómico en células U87-MG con resistencia adquirida a la TMZ (U87-aR). En las células U87-aR, las proteínas de la vía del ribosoma y del espliceosoma se redujeron (274). Los tejidos tumorales GB recurrentes tenían activación de las vías PI3K y MAPK/ERK (también conocidas como Ras-Raf-MEK-ERK). Sin embargo, la fosforilación de AKT y CREB (proteína de unión al elemento de respuesta cAMP) se redujo en las biopsias de tumores resistentes, mientras que la fosforilación de ERK permaneció sin cambios (275).

El aumento del piruvato deshidrogenasa quinasa 1 (PDK1) en células de GB TMZ-R adquirida y que sobre expresan EGFRvIII (U373vIII-aR) respaldan el papel de PI3K/PDK1/Akt en células de GB con resistencia adquirida a TMZ (276). Una proteína de unión a GTP relacionada con Ras RRAD (RAS asociado con diabetes, RAD) se correlacionó con células LN229 con resistencia adquirida a TMZ (LN229-aR) (234). Las células LN229-aR mostraron una formación tumoral rápida y un aumento de las moléculas reguladoras de las células GCS en comparación con las

células LN229 progenitoras. RRAD mejoró la activación de STAT3 inducida por EGFR; la expresión de RRAD se correlacionó con las propiedades asociadas con la malignidad. Los resultados implican que la expresión de RRAD es fundamental para el mantenimiento de las células madre y la resistencia a TMZ en células GB con resistencia adquirida a TMZ (277).

Citocina para la resistencia adquirida a TMZ: en ratones inyectados con células de oligodendroglioma se observa resistencia a TMZ a través de la correlación con la regulación positiva de CXCL (ligando de quimioquinas (motivo C-X-C)) quimioquinas (CXCL2, CXCL3 y CXCL8) (278). Los datos indican que TMZ modifica la red de quimioquinas CXC también en GB (279).

Reparación del ADN y enzimas de respuesta al daño del ADN para la resistencia adquirida a TMZ: el nivel de expresión de MGMT en células GB con resistencia adquirida a TMZ es controvertido. MGMT se sobre expresa en las células GB con resistencia adquirida a TMZ (U373-aR) en comparación con las células originales (233). El aumento de la actividad de alquilguanina -alquiltransferasa (AGT) es el mecanismo resistente a TMZ en las células GB con resistencia adquirida a TMZ (SF188-aR) (280). Además, se observa MGMT sobre-expresada en líneas PDX con resistencia adquirida a TMZ (LX-aR, ME-aR) (273). Por el contrario, la expresión de MGMT no está involucrada en la resistencia adquirida a TMZ en células GB (U251-aR) (281).

Olive et al. encontraron que la expresión de MGMT está regulada a la baja en células GB con resistencia adquirida a TMZ (U251-aR) (282). Otro estudio también encontró que la expresión de MGMT no está involucrada en la resistencia adquirida a TMZ en células GB (U251-aR, U373-aR) (283).

Aunque las células GB con resistencia adquirida a TMZ anteriormente se generaron mediante diferentes métodos, los resultados sugieren que el nivel de expresión de MGMT no está asociado con la respuesta de TMZ, al menos en las células U251-aR, pero puede estar asociado con las células U373-aR. En células GB SNB19-aR con resistencia adquirida a TMZ, la regulación positiva del gen NTL1 de BER y la regulación negativa de la expresión del gen y la proteína MSH6 (MutS Homolog 6) se asoció con la tolerancia a TMZ (284). En otro estudio, la resistencia adquirida a TMZ no se debe a una mayor reparación de las lesiones de O6-metilguanina, sino a una disminución de la actividad de MMR como MSH2 (homólogo 2 de MutS) y MSH6 en células GB TMZ-R adquiridas (U87-aR, LN229-aR, A172-aR) (21).

Metabolismo para la resistencia adquirida a TMZ: la comparación del metabolismo entre las células GB con resistencia adquirida a TMZ y las células sensibles (U373-aR frente a U373) identificó la regulación positiva de la arginina, la leucina, el mioinositol, la taurina y la valina en las células U373-aR que en las células U373 (233). El estudio también encontró una disminución de metabolitos como alanina, colina, creatina y fosforilcolina en las células U373-aR en

comparación con las células U373. En una comparación del metabolismo entre muestras de GB primarias, las muestras de GB primarias TMZ-R mostraron niveles elevados de adenina e isoleucina, pero niveles reducidos de adenosina, glucosa y glutatión en comparación con las muestras de GB primarias TMZ-S. Estos resultados sugieren que existe una discrepancia en la diferencia metabólica entre las muestras primarias de GB y las líneas celulares de GB establecidas para la resistencia adquirida a TMZ.

miARN y lncARN para la resistencia adquirida a TMZ: la expresión de varios miARN aumentó en células GB con resistencia adquirida a TMZ. Por ejemplo, se encontró miARN regulado al alza como miR-10a, miR-195 y miR-455-3p en células GB con resistencia adquirida a TMZ (U251-aR, U87-aR, M059-aR) (281). miR-138 se reguló positivamente en células GB con resistencia adquirida a TMZ (LN18-aR, LN308-aR) en comparación con las células parentales (285). La expresión de miR-138 también aumentó en muestras de tejido de GB recurrentes después de cambiar del tratamiento con TMZ/RT al tratamiento con TMZ (286).

La expresión de miR-1238 fue mayor en las células GB con resistencia adquirida a TMZ (U251-aR) y las células PDX con resistencia adquirida a TMZ (N3-aR) y los exosomas celulares que en las células sensibles. Se encontró un nivel más alto de miR-1238 en tumores recurrentes en comparación con tumores primarios (287). Por el contrario, gran parte de la expresión de miARN disminuyó en los GB TMZ-R adquiridos. miR-101 se reguló significativamente a la baja en células GB con resistencia adquirida a TMZ (A172-aR, U251-aR) y muestras humanas (288).

La expresión de miR-126-3p disminuyó en células y tejidos GB TMZ-R adquiridos (U87-aR, U251-aR) (289). miR-146b-5p se reguló a la baja en células GB con resistencia adquirida a TMZ (U87-aR, U251-aR) (290). La expresión de miR-519a y el nivel de autofagia inicial fue menor en las células U87-MG con resistencia adquirida a TMZ (U87-aR) y en una célula PDX (B131212-aR) en comparación con las células originales (291). miR-519a regula a la baja la expresión de STAT3 y Bcl-2 y aumenta la autofagia y la apoptosis; por lo tanto, la disminución de miR-519a puede inducir resistencia adquirida a TMZ a través de la activación de STAT3. El estudio de expresión de miARN anterior de los mismos GB TMZ-R adquiridos (p. ej., U251-aR), generado por diferentes investigadores, indicó que se pueden identificar diferentes miARN a partir de células GB con resistencia adquirida a TMZ (291).

Un gen de ARN largo no codificante (lncARN) MALAT1 (transcrito 1 de adenocarcinoma de pulmón asociado a metástasis) se reguló significativamente en células GB con resistencia adquirida a TMZ (U251-aR) (292). MALAT1 promovió la quimio-resistencia al suprimir la vía de señalización de miR-101 al unirse directamente a las células U251-aR. Este resultado está respaldado por el hallazgo de que miR-101 se reguló significativamente a la baja en células GB con resistencia adquirida a TMZ (A172-aR, U251-aR) y muestras humanas (288).

Estos datos indican la importancia de la vía MALAT1/miR-101 en la resistencia adquirida a TMZ en GB (293).

Recientemente, ADAMTS9-AS2 lncARN se identificó como significativo y sobre expresado en células GB con resistencia adquirida a TMZ (T98G-aR, U118-aR) (294). La expresión de ADAMTS9-AS2 se correlacionó con la expresión de FUS a través de la unión directa a los dominios RRM y Znf_RanBP2 de FUS y, en consecuencia, aumentó la expresión de la proteína FUS. ADAMTS9-AS2 también ha disminuido la interacción entre FUS y MDM2 mediante la ubiquitinación FUS K48 (294).

Factor de transcripción para la resistencia adquirida a TMZ: los niveles de expresión de MGMT y STAT3 se sobre expresaron en células GB TMZ-R adquiridas (U87-aR). Los niveles de expresión de STAT3 y STAT3 fosforilado (pSTAT3-Ser727) se expresaron altamente en células GB con resistencia adquirida a TMZ (U251-aR, U373-aR); sin embargo, el STAT3 fosforilado (pSTAT3-Tyr705) disminuyó en las células GB con resistencia adquirida a TMZ (21).

Snail, un factor de transcripción y una proteína con dedos de zinc, se regula positivamente en los tumores GB recurrentes. Además de la represión de la molécula de adhesión E-cadherina para regular la transición epitelial a mesenquimatoso (EMT) durante el desarrollo embrionario, Snail promueve la resistencia de GB a la apoptosis inducida por TMZ. La expresión de Snail está modulada por la activación de STAT3. Estos resultados sugieren que la activación de STAT3 es un contribuyente clave para la resistencia TMZ adquirida en GB. El factor de transcripción STAT5b (transductor de señal y activador de la transcripción 5B) y ATRX (helicasa ATRX dependiente de ATP, helicasa II ligada al X o proteína nuclear ligada al X) aumentan en células GBM/PDX con resistencia adquirida a TMZ (295).

ATRX (un regulador transcripcional) y STAT5b (un factor de transcripción) tenían niveles de expresión más altos en las células GB/PDX con resistencia adquirida a TMZ (LN229-aR, HG7-aR, HG9-aR) que en las células parentales. El aumento de la resistencia a TMZ adquirida mediada por ATRX se produce a través del fortalecimiento de la reparación del daño del ADN mediante la proteína PARP1 estabilizadora más alta y la regulación a la baja de la expresión de FADD (proteína asociada a Fas con dominio de muerte) en GB/PDX adquirido resistente a TMZ. Los resultados sugieren que existe un mecanismo novedoso del eje ATRX/PARP1 para la resistencia TMZ adquirida en GB (296).

Genes y proteínas relacionados con la resistencia adquirida a TMZ: En células GB TMZ-R adquiridas (U87-aR, U251 -aR) y GB recurrentes (296). EZH2 (histona-lisina N metiltransferasa) es una histona metiltransferasa que constituye el componente catalítico del complejo represivo polycomb-2 (PRC2); sin embargo, EZH2 también puede metilar proteínas no histonas como el factor de transcripción

GATA4 (proteína de unión a GATA 4) y el receptor nuclear RORA (receptor huérfano relacionado con RAR A) (297).

El transportador de glucosa y la reductasa están asociados con la resistencia adquirida a TMZ. Las células GB con resistencia adquirida a TMZ (T98G-aR, U373-aR) generadas por el tratamiento a largo plazo de células GB humanas con hasta 1 mili mol de TMZ inducen una mayor expresión de los miembros de la familia GLUT/SLC2A del transportador facilitador de glucosa/transportador de solutos, principalmente GLUT- 3 (transportador de glucosa 3) y de la familia de proteínas AKR1C (aldo-ceto reductasa 1C) (297).

Se identifican múltiples proteínas como marcadores de la respuesta de TMZ en las células GB con resistencia adquirida a TMZ. SCD1 (estearoil-coenzima A desaturasa 1) es una enzima limitante de la velocidad clave para la síntesis de ácidos grasos monoinsaturados y se reguló significativamente en células GB con resistencia adquirida a TMZ (U87-aR, T98G-aR) en comparación con sus células parentales, a través de activación de la señalización de Akt/GSK3 β / β -catenina en células GB TMZ-R (297).

La glicosiltransferasa – O – Manosa – b - 1,2 -N – acetil – glucosa – minil - transferasa (PomGnT1), que participa en la formación de GlcNAc- β 1,2-Man glicano, se reguló significativamente en células GB con resistencia adquirida a TMZ (U87-aR, U251-aR) en comparación con las células TMZ-S. Se observó un aumento de la expresión de P4HB (prolil 4-hidroxilasa, polipéptido beta) en células GB con resistencia adquirida a TMZ (D54-aR, U87-aR) (297).

La proteína 14 (Fn14) inducible por el factor de crecimiento de fibroblastos se expresó en gran medida en GB recurrente y en células PDX TMZ-R derivadas de pacientes con GB in vivo. La proteína Fn14 se expresó en gran medida en xenoinjertos derivados de pacientes GB con resistencia adquirida a TMZ. La expresión de CD133 (también conocida como prominina-1, una glicoproteína, el marcador de superficie celular utilizado con mayor frecuencia para detectar CSC) fue significativamente mayor en el tejido GB recurrente que en sus respectivos brotes recién diagnosticados (297).

Los potenciadores son elementos reguladores que pueden promover la expresión génica. Un potenciador (potenciador K-M), ubicado entre los promotores del marcador de precursor Ki67 (MKI67) y los genes MGMT, se activa en líneas PDX adquiridos TMZ-R (GB12-aR) y muestras de brotes recurrentes. La activación del potenciador se correlacionó con una mayor expresión de MGMT, un mecanismo bien conocido para la TMZ-R. El perfil genómico utilizando xenolinas TMZ-R adquiridos identificó una actividad quinasa significativamente alterada en las xenolinas TMZ-R (dos de los cinco tumores) [105]. El modelo de red sugirió que la resistencia potencial a TMZ está mediada por PKC, JAK1, PI3K, CDK2 y VEGFR (Figura 14) (297).

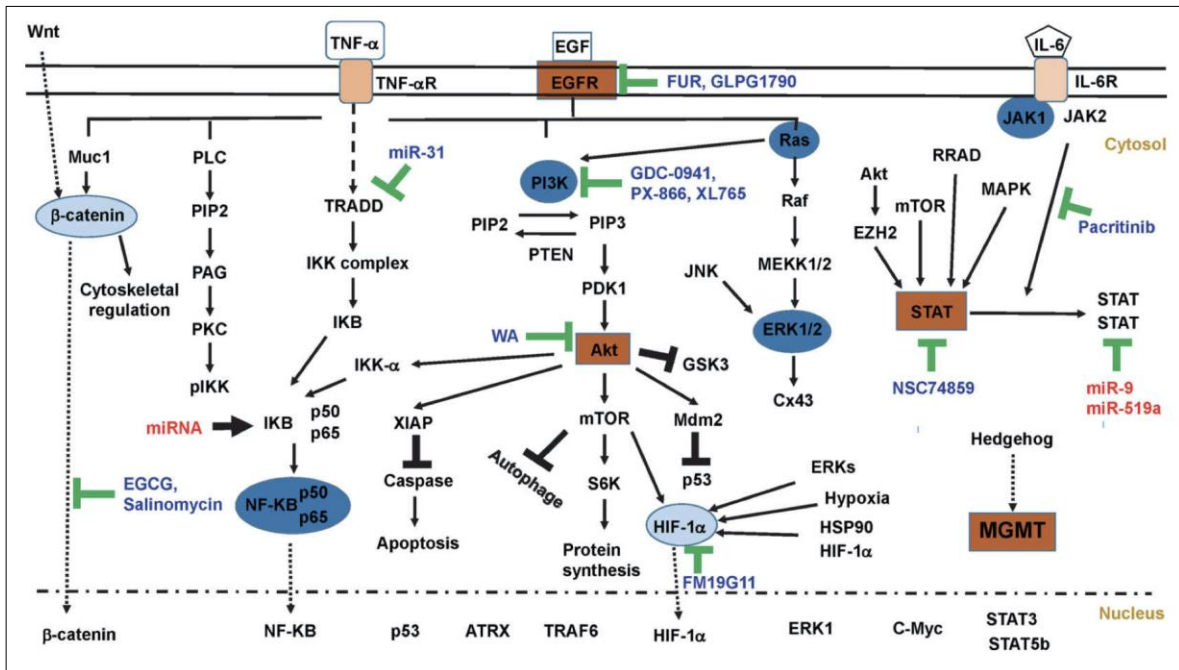


Figura 14. Esquema: células GB/PDX TMZ-R innatas y adquiridas. Las células GB TMZ-R innata tienen diferentes vías de señalización para TMZ en comparación con las células GB TMZ-S. Además de la activación de la vía Wnt/ β -catenina/MGMT, las células GB/PDX innatas TMZ-R tienen activación de la vía EGFR/MAPK/STAT, la vía Akt/mTOR/HIF-1 α y la vía hedgehog/MGMT. Las células GB/PDX con resistencia adquirida a TMZ tienen canales más diversos, como la vía EGFR/JNK/ERK activada, la vía hedgehog, la vía NF- κ B, la vía PI3K/Akt, la vía Ras y la vía MAPK/ERK.

Fuente: modificado de: Ramasamy Paulmurugan, et al. Glioblastoma Resistance to Chemotherapy: Molecular Mechanisms and innovative reversal strategies. Vol 15, 2021, p:89.

2.4.2 Mecanismos de quimio-resistencia de las células madre (GSC)

Además de la BHE, que representa un escudo de primera línea contra las moléculas terapéuticas, los HGG y su principal exponente el GB explotan una plétora de armas extracelulares, celulares y moleculares para escapar de la terapia, ya sea obstaculizando la absorción del fármaco o anulando su efecto tóxico (298).

Las GSC no solo son el centro de la iniciación del tumor, sino también el combustible inmortal de la quimio-resistencia, debido a su equipo molecular innato y adquirido. Por lo tanto, los mecanismos moleculares responsables de la quimio-resistencia de GSC han atraído el interés por sus posibles aplicaciones

terapéuticas. El escenario, sin embargo, parece muy complejo, ya que la quimio-resistencia no solo es atribuible a las GSC, sino también a otros mecanismos celulares, como la transformación de células proneurales y endoteliales en células madre mesenquimales (57).

Además, los mecanismos moleculares involucrados anticipan la expresión de los transportadores de salida, la activación de los mecanismos de reparación del ADN (como la MGMT, BER, MMR), el cambio metabólico, la autofagia lo cual depende de la expresión de varios genes. Por otro lado, los mecanismos extracelulares juegan un papel fundamental, que involucra la BHE, el microambiente tumoral y la resistencia inmunológica (21).

La recurrencia de GB está indisolublemente ligada a las GSC, ya que son la esencia resistente del tumor. Aunque las GSC representan solo una pequeña subpoblación del tumor, se cree que son las células a partir de las cuales se inicia el tumor (299). Las GSC se derivan de las células madre neurales (NSC) que residen en la zona subventricular, después de mutaciones genéticas impulsoras (300). Comparten con ellas muchas moléculas comunes como la nestina, CD133, CD15, SOX2 y otras propiedades que las diferencian, como: la capacidad de auto-renovación, un alto potencial proliferativo, la capacidad de generar una progenie diferenciada, la asociación con los vasos sanguíneos, y la comunicación con los componentes del nicho, incluidos los astrocitos y la matriz extracelular. Al igual que las NSC, las GSC poseen bombas de flujo molecular capaces de excluir colorantes y fármacos de la célula, lo que las hace resistentes a las terapias estándar (301).

Los tratamientos anticancerígenos estándar matan las células tumorales, lo que da como resultado una reducción temporal del tumor, pero las GSC, que están armadas con defensas moleculares contra la entrada y/o actividad de los fármacos, sobreviven al tratamiento y forman en breve una nueva masa tumoral más agresiva (302). Además, la plasticidad de las GSC hace que las terapias actuales sean aún más ineficaces, ya que, en la población de células resistentes preservadas, permite la aparición de las células más adecuadas para soportar las terapias posteriores. Por lo tanto, se han dedicado importantes esfuerzos de investigación para identificar objetivos moleculares específicos de GSC con el fin de desarrollar terapias capaces de eliminar por completo los GB recurrentes (303).

Las GSC se pueden caracterizar en función de sus propiedades funcionales y moleculares. Los ensayos funcionales incluyen la actividad del aldehído

deshidrogenasa (ALDH) (304) y el eflujo del colorante Hoechst de ADN, este último no considerado uniformemente como un ensayo adecuado (305).

Se ha informado que marcadores de superficie y no superficiales, como CD133, CD15/SSEA1, CD44, PDGFR, NOTCH, nestina, musashi-1, EZH2, STAT3 y nanog, identifican y caracterizan las GSC in vitro e in vivo, aunque la validez de algunos de ellos como marcadores de GSC es controvertida (306). La capacidad de las GSC para generar GB puede probarse mediante xenotrasplante en ratones receptores, que dan lugar a tumores histológicamente idénticos al tumor de origen. Además, el "ensayo de formación de esferas" in vitro, el xenotrasplante de GSC cultivadas in vitro o derivadas de pacientes, representa el estándar funcional para determinar su capacidad de iniciación tumoral, que es una medida de su capacidad para promover las recaídas (306).

Los principales mecanismos de resistencia en las GSC son la reparación aberrante del ADN, alteraciones en la regulación de los puntos de chequeo, alteración en la regulación en la división de las células del GB a la recurrencia, disfunción en las bombas de eflujo, plasticidad fenotípica y trans-diferenciación, escape de la apoptosis, autofagia, metabolismo celular alterado, disfunción de las vías de señal extracelular, secreción de exosomas, sobre activación de los receptores de tirosinaquinasa (RTK), cambios en el microambiente tumoral, alteraciones en el nicho perivascular y disfunción de la BHE (20).

2.4.2.1 Reparación aberrante del ADN

Los agentes alquilantes inducen aductos de metilación de varias bases nitrogenadas del ADN, generando ruptura de doble cadena (DSB), lo que finalmente conduce a la apoptosis. Se utilizan dos tipos de agentes alquilantes contra GB, las nitrosoureas cloroetilantes como el BCNU y triazenos como la TMZ (123). La TMZ alquila la posición N⁷ de la guanina y la posición N³ de la adenina o inducen la cloroetilación en la posición O⁶ de la guanina; este último provoca un entrecruzamiento N1-desoxiguanosinil-N3-desoxicitidil (G-T), que no puede corregirse adecuadamente, dando lugar a roturas de las cadenas de ADN durante la mitosis. En las células que expresan p53 de tipo salvaje, el daño del ADN inducido por TMZ conduce a la apoptosis, mientras que mata las células por necrosis en las células que carecen de p53 funcional. Por lo tanto, es efectiva incluso en ausencia de un sistema de reparación activo (307).

Como se explicó, la TMZ a pH fisiológico, se convierte en su compuesto activo MTIC, que induce la metilación del ADN en la posición el O⁶ y el N⁷ de la guanina, los N³ y N¹ de la adenina y el O⁴ de la timina, lo que resulta en la activación de dos mecanismos de reparación diferentes: mientras que la metilación en la posición O⁶ de la guanina genera un emparejamiento incorrecto de bases con la timina en el primer ciclo de replicación (O⁶G-T) e induce ciclos fútiles de MMR, la metilación de la posición N⁷ de guanina o la posición N³ de adenina activan BER (Fig. 16). Los sistemas MMR y BER, a su vez, están regulados por PARP-1, que detecta el daño, recluta proteínas reparadoras del ADN y MMR conduce a la muerte celular por apoptosis, pero BER repara parte del daño causado por la TMZ (21).

Este proceso genera DSB en el sitio apurínico/apirimidínico; el consiguiente colapso de la horquilla de replicación induce lesiones terciarias como DSB y el intercambio de cromátidas hermanas, que finalmente desencadenan la respuesta al daño del ADN (DMR) y la apoptosis (307). Por esta razón, la terapia con TMZ requiere que el sistema funcional de reparación MMR del ADN para que sea eficaz (Figura 15) (307).

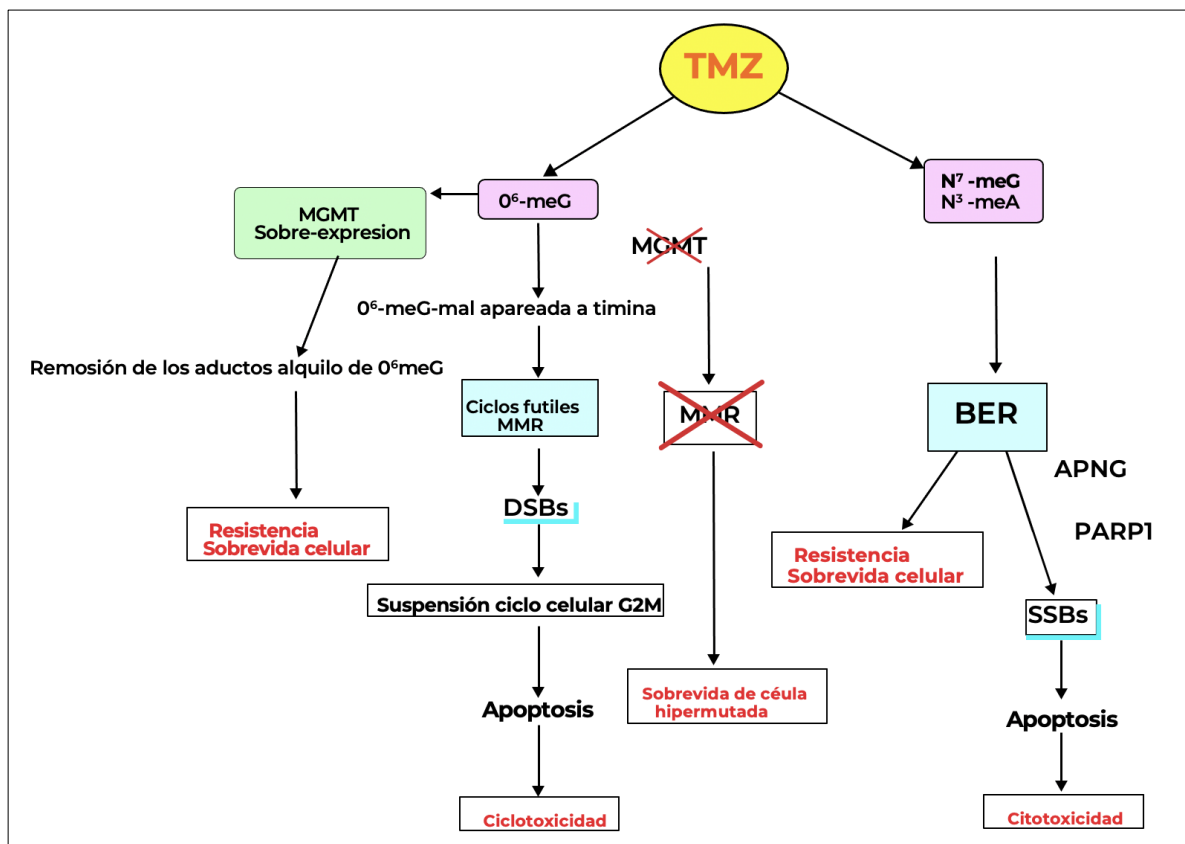


Figura 15. Citotoxicidad y mecanismos de resistencia. La TMZ da origen a la O⁶-m^G, que se aparea a la timina en vez de la citosina y el sistema MMR repara solo la

cadena que contiene la timina, dejando intacta la que tiene la guanina metilada, y a medida que se van acumulando llevan a DSB, suspensión del ciclo celular en fase G2M y apoptosis causando citotoxicidad. El otro mecanismo de acción de la TMZ es metilando la guanina en la posición 7 (N⁷-MeG) o la adenina en la posición 3 (N³-MeA), que si son reparadas por los sistemas BER (iniciado por APNG) o PARP1 llevaría a resistencia y sobrevida celular, pero si estos no funcionan adecuadamente, llevaría a SSB y apoptosis.

Fuente: modificado de: Ramasamy Paulmurugan, et al. Glioblastoma Resistance to Chemotherapy: Molecular Mechanisms and innovative reversal strategies. Vol 15, 2021, p: 373.

Los DSB, también generados por radiación ionizante, fármacos genotóxicos y especies reactivas de oxígeno (ROS), son las lesiones más dramáticas para el material genético de los mamíferos. Las células han desarrollado una enorme maquinaria molecular para detectar el daño y activar un efecto en cascada en los puntos de control del ciclo celular, la detención del ciclo celular y finalmente la reparación, realizada ya sea por recombinación homóloga (HR) o por unión de extremos no homólogos (NHEJ), mecanismos de reparación que deben estar inactivos, para que no se repare la célula tumoral y enfrente el proceso de apoptosis (308).

En células no tumorales de ciclo activo, las DSB son reparadas por proteínas HR, como Rad51, XRCC2, XRCC3, BRCA1, BRCA2, y proteínas del complejo de control de daños Mre11/Rad50/Nbs1 (MRN), que resintetizan una copia fiel de ADN, una vez que se complementan sin daños y la cromátida hermana está disponible como plantilla. Por el contrario, las células en las fases G0 y G1, en su mayoría corrigen los DSB mediante proteínas NHEJ, incluida la proteína quinasa dependiente de ADN (ADN-PK) (constituida por las subunidades Ku70/80 y ADN-PKcs), la ADN ligasa IV (Lig4), XRCC4 y Artemis, que, al no necesitar una plantilla, modifican la información genética original (309).

La principal característica que hace que las GSC, a diferencia de las células tumorales no madre, sean resistentes a la QT y la RT actuales dirigidas a la replicación del ADN, es su maquinaria de reparación del ADN más eficiente y la expresión constitutiva de las proteínas de reparación del ADN (303) (310) maquinaria similar permite células de glioma CD133+, a diferencia de las otras, sobrevivir tanto a las radiaciones ionizantes como a los agentes alquilantes (301).

Tanto la RT como la TMZ inducen un aumento en la subpoblación CD133+ (311), lo que sugiere que estos tratamientos promueven la selección de células madre

cancerosas resistentes, responsables de la recurrencia (301). Dado su papel dramático en la resistencia a GB, los mecanismos de reparación del ADN son objeto de una intensa investigación, con el fin de identificar terapias efectivas (57).

Entre las herramientas de reparación del ADN, las GSC sobre expresan, en comparación con las células GB diferenciadas, la MGMT. Esta elimina los aductos de alquilo de la posición O⁶ de la guanina, comprometiendo los efectos citotóxicos de los agentes alquilantes. Mientras que el sistema BER es hiperactivo en GB (306), las proteínas MMR se pierden con frecuencia en las GSC (312), lo que permite que estas células se repliquen a pesar del daño en el ADN inducido por fármacos, por lo tanto, no solo la terapia es ineficaz, sino que también induce mutaciones adicionales que dan como resultado una amplia variación en la capacidad de respuesta clínica (20).

El inhibidor de poli ADP-ribosa polimerasa 1 (PARP-1) se encuentra regulado al alza en las GSC (313) y junto con los otros sistemas de reparación, permite seleccionar una población de células capaces de superar la carga del daño del ADN inducido por la QT y la RT. Diferentes factores de transcripción controlan el mantenimiento de GSC y activan las vías de reparación del daño en el ADN, lo que contribuye a la resistencia terapéutica de GB, e incluyen OLIG2, c-Myc, BMI1, SOX2, NANOG, OCT4 e ID1. Todos estos están sobre-expresados en GB recurrente como un resultado de la sobre activación de vías de señalización extracelular, regulación epigenética y acción de microARN (314).

De manera similar, se ha demostrado que la amplificación y mutación del EGFR que conduce a la variante III del EGFR independiente del ligando, constitutivamente activo (EGFRvIII) aumenta la reparación y la recurrencia de la DSB en cultivos de células GB y en pacientes con GB (315). Además, la regulación al alza de la señalización de PI3K/Akt y la pérdida de fosfatasa supresora de tumores y homólogo de tensina (PTEN) son responsables de la resistencia a la terapia al aumentar la reparación del ADN (310).

2.4.2.2 Desregulación de los puntos de control del ciclo celular

Las GSC no tratadas están equipadas con una mayor activación basal de los puntos de control (312), lo que conduce a ciclos celulares extremadamente prolongados y permite que las GSC corrijan los daños en el ADN inducidos por la terapia, por lo que contribuye a la resistencia (310). Además, las GSC pueden recuperarse aberrantemente del daño en el ADN inducido por la RT y la QT debido

a una segunda maquinaria desregulada, que es la que está predispuesta a verificar la corrección del ADN, antes de permitir que continúe el ciclo celular; la llamada vía del punto de control del daño del ADN (310).

Después de los DSB, el complejo MRN activa las quinasas mutadas por ATM y las relacionadas con Rad3 (ATR) que fosforilan las enzimas posteriores, lo que desencadena la detención del ciclo celular (lo que permitiría que se reparara el daño por HR y NHEJ antes de la llegada de la horquilla de replicación) y la apoptosis (Fig. 17). Mientras que ATM responde a DSB, ATR es activado por tramos de ADN monocatenario, que se forman como consecuencia de horquillas de replicación estancadas.

En particular, ATM fosforila la histona H2AX, produciendo γ -H2AX (un indicador indirecto de DSB), que a su vez recluta las proteínas de reparación de ADN, la 53BP1, MDC1, RAD51, BRCA1 y el complejo MRN, a los sitios de DSB (316) y colapso de la horquilla de replicación (317). ATM y ATR también fosforilan las quinasas de punto de control 1 (Chk1) y 2 (Chk2), que detienen el ciclo celular en las fases G1/S, S o G2/M (310). Mientras que la expresión de Chk1 se limita a las fases S y G2 del ciclo celular y es activa incluso en ausencia de daño en el ADN, Chk2 se expresa constitutivamente durante el ciclo celular (318), pero se activa solo después de la respuesta mediada por ATM a DSB. Aun así, Chk1 es capaz de responder a la horquilla de replicación estancada y al ADN dañado (319).

Estas dos quinasas dificultan la progresión del ciclo celular en presencia de daño en el ADN. En las GSC, su actividad aumenta constitutivamente, lo que hace que las células sean insensibles a los fármacos que dañan el ADN (306). En consecuencia, los inhibidores específicos de Chk1 y Chk2 pueden sensibilizar a las GSC CD133⁺ a la terapia (301). ATM también fosforila el supresor tumoral p53, que induce la activación de p21, seguida de una inhibición del ciclo celular dependiente de ciclina (320).

En células con niveles adecuados de p53, la TMZ induce la detención de G2-M mediada por p53 y p21, lo que lleva a la apoptosis y senescencia celular. En ausencia de p53, la TMZ es capaz de inducir solo una detención temporal de G2-M, lo que hace que las células tumorales puedan reparar el daño causado por la TMZ y puedan sobrevivir a la terapia, al pasar de la detención G2-M inducida por la TMZ a dividirse y quedarse en G1 para ser reparada por HR o S/G2 para ser reparada por NHEJ, resistiendo a los efectos de la TMZ (Figura 16) (307).

Es importante el adecuado funcionamiento de p53 que fosforila p21y detiene permanentemente el ciclo celular llevando a apoptosis, ya que la detención temporal lo que permite es la reparación por NHEJ y HR, revirtiendo el efecto de la TMZ.

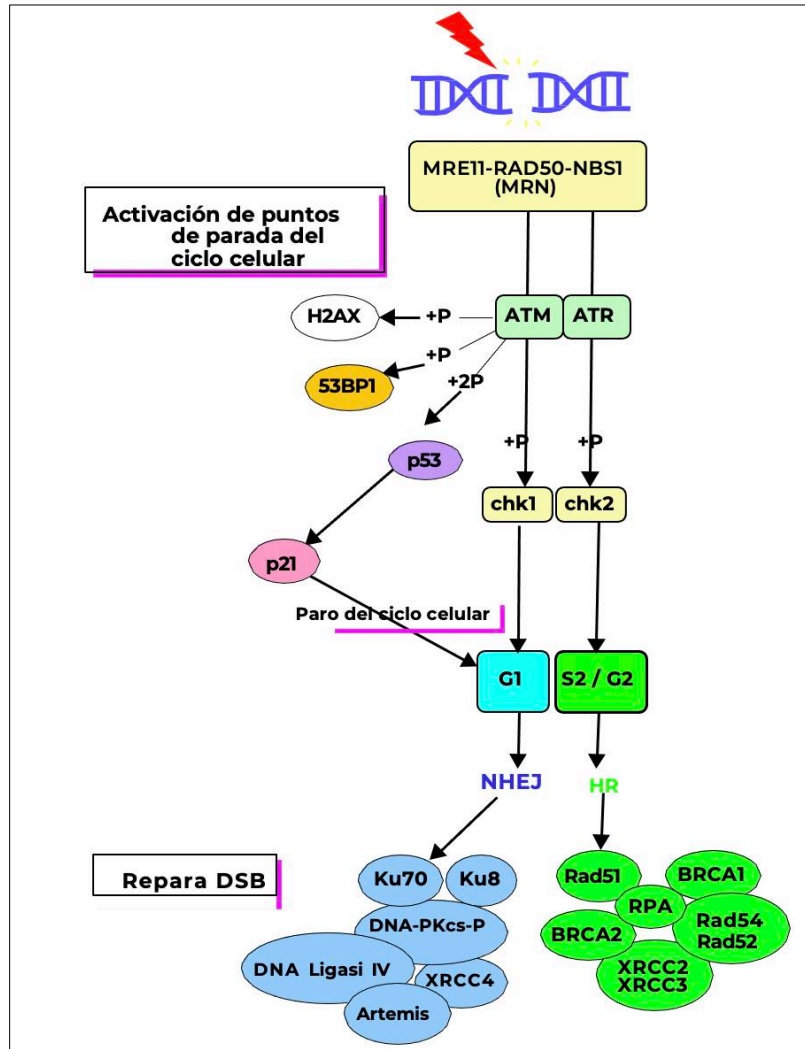


Figura 16. Esquema de puntos de control y reparación del ADN. Los daños en el ADN causados por la TMZ son reparados por proteínas del complejo de control de daños Mre11/Rad50/Nbs1 (MRN), que resintetizan una copia fiel de ADN. Los DSB activan ATM/ATR.

Fuente: modificado de Ramasamy Paulmurugan, et al. Glioblastoma Resistance to Chemotherapy: Molecular Mechanisms and innovative reversal strategies. Vol 15, 2021, p: 374.

2.4.2.3 Escapar de la apoptosis

El papel clave de la mayoría de los agentes quimioterapéuticos es inducir a las células cancerosas a cometer suicidio a través de la una de las formas de muerte celular programada más estudiadas, la apoptosis. A nivel molecular, se han delineado dos vías principales de señalización (extrínseca, mediada por receptores de muerte, e intrínseca, mediada por mitocondrias) que están involucradas en la regulación de la muerte celular apoptótica y eventualmente conducen a la activación de caspasas como un mecanismo efector común (12).

Las caspasas son una familia de cisteína proteasas que están presentes como proenzimas inactivas en el citosol y se activan durante la apoptosis por su escisión proteolítica en residuos de aspartato específicos y activan una amplia gama de proteínas directamente involucradas en la muerte celular apoptótica. La acción de la caspasa es contrarrestada por las moléculas inhibitoras de la apoptosis (IAP), que a su vez son inhibidas por las proteínas Smac/Diablo (321). El supresor de tumores p53, que es activado por los agentes quimioterapéuticos, está aguas arriba de las vías apoptóticas tanto en la vía intrínseca como extrínseca, lo que induce la apoptosis con un tratamiento agresivo (322).

Los GB recurrentes, han desarrollado diferentes mecanismos para escapar de la apoptosis, lo que permite su resistencia tanto a la RT como a la QT. Para tener una adecuada respuesta a la TMZ, deben funcionar adecuadamente las vías de transducción de señales hacia la muerte celular, y la reactivación de programas de muerte celular defectuosos se considera actualmente como un enfoque prometedor para el tratamiento del cáncer (323). Como ya se mencionó, las proteínas del punto de control del daño del ADN pueden hacer que las células cancerosas sean más resistentes a la apoptosis inducida por la terapia a través de una mayor eficiencia en la reparación del ADN dañado. En particular, MGMT elimina los aductos de alquilo mutagénicos, protegiendo así el ADN del daño inducido por TMZ (12).

Por lo tanto, la pérdida de expresión de MGMT por la hipermetilación de su promotor aumenta la sensibilidad al tratamiento con TMZ, mientras que su sobreexpresión, frecuentemente observada en GB recurrentes, debido a la regulación epigenética, puede ser responsable de la resistencia de GSC a la TMZ (265). Recientemente se ha demostrado que el inhibidor de la subunidad épsilon de la cinasa de NF-kB aumenta la resistencia de las células GB a TMZ mediante la activación de la vía de señalización de AKT/NF-kB para regular la expresión de MGMT (324).

Sin embargo, incluso en pacientes con GB con metilación de MGMT, los GB recurrentes han activado vías alternativas para escapar de la apoptosis. Efectuando perfilamiento de proteínas expresadas en GB de 36 pacientes metilados con MGMT, se identificó la sobreexpresión del factor inhibidor de la migración de macrófagos en los que se observaron desenlaces de supervivencia bajos (325).

Como mecanismo adicional, se ha informado que los GB recurrentes muestran niveles elevados de la proteasa específica de ubiquitina USP4, un regulador negativo de p53, lo que contribuye a escapar de la apoptosis después del tratamiento con TMZ. De hecho, cuando las células silenciadas de USP4 se trataron con TMZ, la viabilidad celular disminuyó significativamente de manera dependiente de p53 (326).

2.4.2.4 Vías de señalización extracelular

El microambiente tumoral del GB consta de diferentes poblaciones celulares, incluidas células tumorales, células endoteliales, pericitos de vasos sanguíneos, células inmunitarias innatas (microglía, monocitos, macrófagos, neutrófilos y mastocitos), células T, neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y GSC, y los diferentes componentes de la matriz extracelular (MEC). Los factores de crecimiento y las citoquinas, así como los contactos de células tumorales y las interacciones tumor-estroma, activan diferentes vías moleculares en las células tumorales que contribuyen a la quimio-resistencia en GB recurrente (327).

2.4.3 Redes de señalización intracelular involucradas en la resistencia

El desarrollo de NGS ha identificado la implicación de mutaciones genéticas y cambios epigenéticos y está permitiendo encontrar los mecanismos moleculares implicados en la naturaleza refractaria de los GB. Además, las técnicas de análisis desarrolladas recientemente, como la secuenciación de ARN de una sola célula, han revelado funciones críticas de la amplia heterogeneidad intratumoral y la plasticidad en la regulación de la quimio-resistencia de los HGG (328). En consecuencia, la comprensión de las redes de señalización molecular que subyacen a la quimio-resistencia es de suma importancia para superar la naturaleza refractaria de estos tumores.

2.4.3.1 Estrés de replicación de ADN inducido por TMZ

La respuesta al daño del ADN o DMR, es la vía más fundamental en la maquinaria molecular inducida por Qt de los GB. El tratamiento con TMZ puede desencadenar la DMR y provocar la detención del ciclo celular o la muerte de los GB. En las células normales, la TMZ induce la metilación de los residuos de adenina y guanina en el ADN (N⁷-guanina, N³-adenina y O⁶-guanina), seguida de MMR y BER (79). La metilación del O⁶-guanina mediada por la TMZ es la modificación de ADN más importante en la muerte celular inducida por TMZ, ya que muestra la mayor toxicidad, a pesar de la menor frecuencia de aparición (85).

La modificación del ADN de O⁶-guanina mediada por TMZ provoca un emparejamiento anormal de esta guanina con timina en lugar de citosina; esto es seguido posteriormente por la activación del sistema MMR. Sin embargo, el sistema MMR elimina repetidamente solo las hebras recién sintetizadas o sea las que tienen timina, mientras que las cadenas con O⁶-guanina modificadas no se ven afectadas. El sistema mediado por MMR continúa con su inútil ciclo de reparación del ADN y finalmente induce un estancamiento de la replicación del ADN, que posteriormente desencadena una SSB seguida de DSB del ADN. Este estrés de replicación del ADN inducido por TMZ junto con los DSB finalmente activa el DMR en las células para inducir la detención del ciclo celular o la muerte celular de los GB (329).

Se sabe que la MGMT, una enzima reparadora del ADN codificada por el gen MGMT, revierte esta metilación del ADN inducida por TMZ del O⁶-guanina. En GB, se observa metilación del promotor de la MGMT en un 45% de los pacientes evaluados por PCR (7). Los casos de GB con metilados muestran un buen pronóstico bajo tratamiento con TMZ en comparación con los casos de promotor no metilado de MGMT (7). Por lo tanto, la metilación del promotor MGMT posiblemente determina el pronóstico en los GB tratados con TMZ. Sin embargo, evidencia reciente ha demostrado que los casos de GB con metilación del promotor muestran un buen pronóstico incluso sin tratamiento con TMZ (330). Esto sugiere que el estado de metilación del promotor de MGMT puede ser un sello distintivo de un buen pronóstico de los casos de GB, incluso sin tratamiento con TMZ.

La vía de las proteínas de reparación de errores de emparejamiento (MMR), conformada por MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2, entre otras, es un mecanismo alternativo que subyace a la TMZ-R. La vía MMR está compuesta por varias proteínas, como MLH1, PMS2, etc., y desempeña un papel importante en la neutralización de la toxicidad de la O^{6-mG}. La vía MMR desempeña un papel

importante en el mantenimiento de la estabilidad genómica al corregir los errores generados, como los desajustes entre bases y los desajustes de inserción/delección durante la replicación del ADN.

La vía MMR previene las mutaciones permanentes en las células que se dividen y reduce el número de errores relacionados con la replicación, lo que resulta en la prevención tanto de la mutagénesis a corto plazo como del tumor génesis a largo plazo. Cuando la timina y la $O^6\text{-mG}$ no coinciden, la timina de la hebra hija se elimina de forma dependiente de MMR. Sin embargo, debido a que la $O^6\text{-mG}$ permanece en la hebra molde, se introduce una nueva timina en el sitio y los ciclos repetidos de MMR conducen a roturas de la doble hebra (12).

Las proteínas MMR MutS α y MutL alfa son necesarias para la señalización del daño por alquilación y la inducción de la apoptosis, lo que conduce a la activación de numerosos objetivos posteriores, como p53, Chk1, Chk2, SMC1 y CDC25A. Por lo tanto, los defectos en la vía de MMR dan como resultado tolerancia al emparejamiento incorrecto de $O^6\text{-mG}$, lo que contribuye a la resistencia a los medicamentos. De hecho, se ha demostrado que una mayor capacidad de MMR aumenta la sensibilidad a TMZ (331).

La regulación a la baja de la función del homólogo 6 de la proteína MutS (MSH6) también se considera crítica en el mecanismo molecular subyacente a la TMZ-R. Primero se forma un complejo heterodímero de proteína MutS con homólogo 2 (MSH2) o sea MSH2-MSH6 en una base no coincidente que posteriormente recluta el heterodímero MLH1-PMS2 para iniciar la escisión de la base no coincidente e incorporar una nueva base (285).

En GB, la supresión de la expresión de MSH6 se observa en los casos recidivantes después de la terapia primaria mediada por TMZ (332); además, una mutación de MSH6 contribuye a la resistencia contra TMZ. La regulación a la baja de la expresión de MSH2 en células GB da como resultado la adquisición de resistencia contra el tratamiento con TMZ in vitro, y la expresión más baja de MSH2 en casos clínicos de GB se correlaciona con una respuesta deficiente en la terapia primaria mediada por TMZ (333). Estos resultados reafirman que la regulación a la baja de los niveles de expresión de MSH6 o MSH2 y sus funciones son fundamentales para la TMZ-R en GB.

Recientemente, la metilación de N^7 inducida por TMZ también ha recibido atención como un factor regulador de la respuesta terapéutica de TMZ en la terapia GB. En los GB TMZ-R regulados a la baja por MMR, la inhibición de la enzima reparadora

del ADN PARP, vuelve a ocasionar las SSB que se habían corregido por la vía BER en la metilación de N⁷ inducida por la TMZ, induciendo la muerte celular de los GB (334). Además, la expresión de la enzima APNG reparadora por escisión de bases en N⁷ y N³ inducidas por TMZ, también confiere resistencia a la TMZ en GB y está asociada con pobre supervivencia en los pacientes (335). Estas pruebas sugieren que las modificaciones de la metilación de N⁷, N³ y O⁶ inducidas por TMZ juegan un papel importante en la determinación de la respuesta de TMZ en la terapia GB (Figura 17).

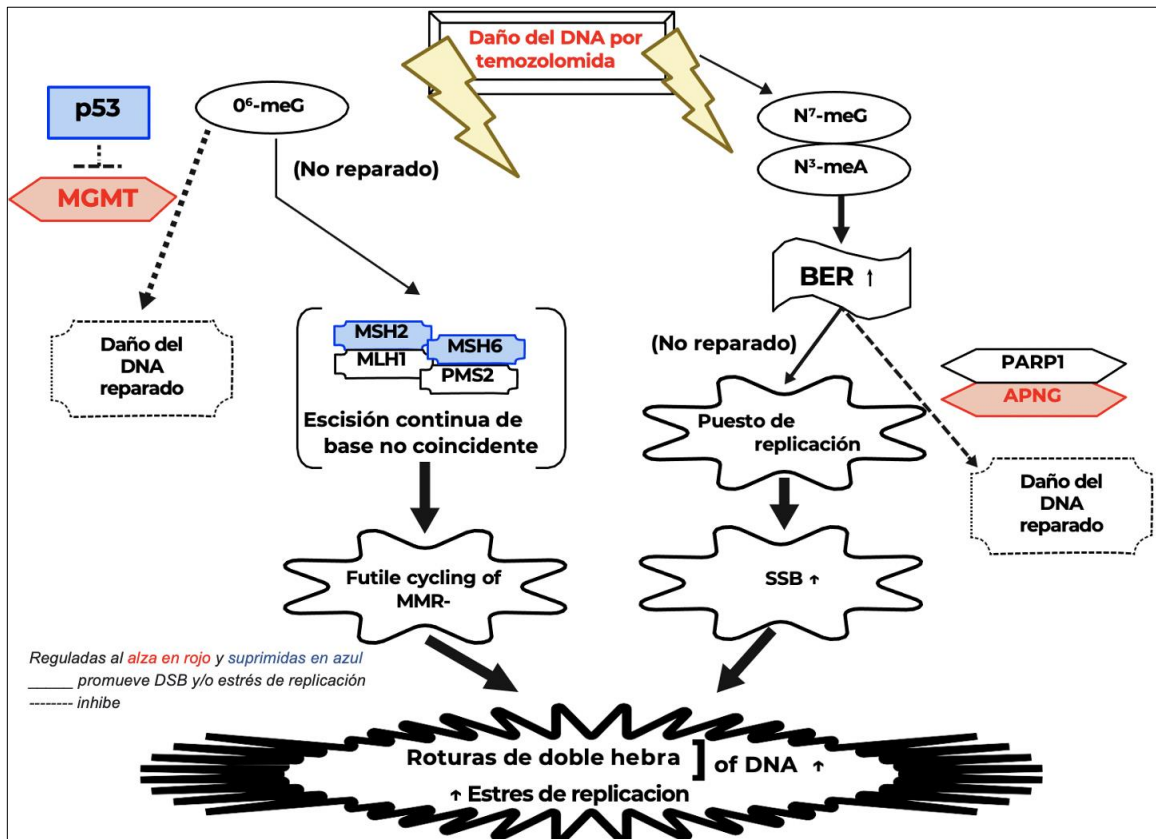


Figura 17. Transducción de señales inducidos por TMZ en gliomas, se presenta resistencia a la TMZ por un exceso de MGMT, o por déficit de p53 (que frena MGMT) o alguno de los componentes de MMR.

Fuente: modificado de Ramasamy Paulmurugan, et al. Glioblastoma Resistance to Chemotherapy: Molecular Mechanisms and innovative reversal strategies. Vol 15, 2021, p: 552.

2.4.3.2 Respuesta al daño del ADN o DMR inducida por TMZ

Vías ATM y ATR: los DSB y el estrés de replicación mediado por TMZ estimulan la activación de DMR. Las DSB activa un proceso que se orquesta a través de una activación secuencial de varias moléculas que desencadenan dos vías: la vía

mediada por la proteína tumoral p53 (ATM-CHK2-p53) del punto de control quinasa 2 (CHK2) mutado en ataxia-telangiectasia (ATM) y la vía mediada por ataxia-telangiectasia relacionada con RAD3 (ATR)-punto de control quinasa 1 (CHK1) (vía ATR-CHK2) (336).

Después de detectar el daño del ADN desencadenado por TMZ (DSB) y el estrés de replicación, se activan ambas cascadas y el factor de transcripción p53 (un regulador principal de DMR) se estabiliza y activa mediante la fosforilación mediada por ATM, ATR, CHK1 y CHK2. Se ha confirmado que las mutaciones puntuales de p53 ocurren con frecuencia en los casos de GB, lo que desencadena la resistencia contra el tratamiento con TMZ. Además, CHK2 fosforila la proteína tirosina fosfatasa, ciclo de división celular 25C (CDC25C); esto induce la detención del ciclo celular por una degradación mediada por fosforilación de CDC25C (337). En TCGA se demostró que la eliminación heterocigota de CHK2 está presente en aproximadamente el 20 % de todos los casos de GB (338), lo que sugiere que CHK2 es un regulador fundamental de la proliferación de células GB durante el tratamiento con TMZ.

Por otro lado, el estrés de replicación del ADN inducido por TMZ desencadena la activación de la cascada ATR-CHK1. Es importante destacar que un informe reciente demostró que TMZ activa fuertemente la cascada del inhibidor de la quinasa 1 dependiente de la ciclina p21, que es un gen que codifica la proteína CDKN1A) (ATR-CHK1-p21) en las células de GB y esto da como resultado la detención de las células en la fase G2/M. Esto indica además que TMZ induce una detención persistente del ciclo celular en los GB en lugar de causar su muerte celular a través de la hiperactivación de la cascada que da como resultado la supresión del crecimiento de los GB, lo que confirma que es en esencia, un citostático (339) (Figura 19).

Regulación de p53: dependiente aguas abajo de la cascada de DMR mediada por ATM y ATR inducida por TMZ u otros agentes quimioterapéuticos, el factor de transcripción p53 orquesta varias respuestas biológicas, como autofagia, detención del ciclo celular indefinida en G2/M, senescencia celular, reparación del ADN y muerte celular; estas respuestas dependen de sus niveles de expresión y activación.

En su estado no estimulado, la expresión de la proteína p53 se suprime constantemente por la degradación causada por una asociación continua con la ubiquitina ligasa E3 de ratón doble minuto 2 (MDM2) en su dominio de transactivación N0-terminal](340). Una vez que la DMR se activa mediante un

tratamiento farmacológico u otros estímulos, como estrés oxidativo, irradiación y fosforilación mediada por ATM y ATR, p53 se estabiliza disociándose de MDM2 y se activa formando tetrámeros en su forma activa; posteriormente, se une a las regiones promotoras de sus moléculas diana (341).

Un conjunto de datos de TCGA reveló que uno de los genes mutados con mayor frecuencia en GB es *TP53* (gen que codifica p53) (338) En particular, se observan mutaciones puntuales heterocigóticas de TP53 en aproximadamente el 30 % de todos los casos de GB en múltiples sitios de sus dominios moleculares. Estos se informan como mutantes de pérdida de función de TP53; sin embargo, el antagonismo de p53 de tipo salvaje, producido por un alelo no mutado durante la formación de tetrámeros o la ganancia de función mediante la formación de una estructura similar a una hoja beta que evade la proteólisis y forma agregación intracelular, también se ha informado como una función oncogénica adicional de p53 mutante (342). Por lo tanto, las mutaciones de TP53 en GB pueden servir como oncogenes más poderosos en comparación con la simple pérdida de función debido a la mutación de un solo alelo (Figura 18).

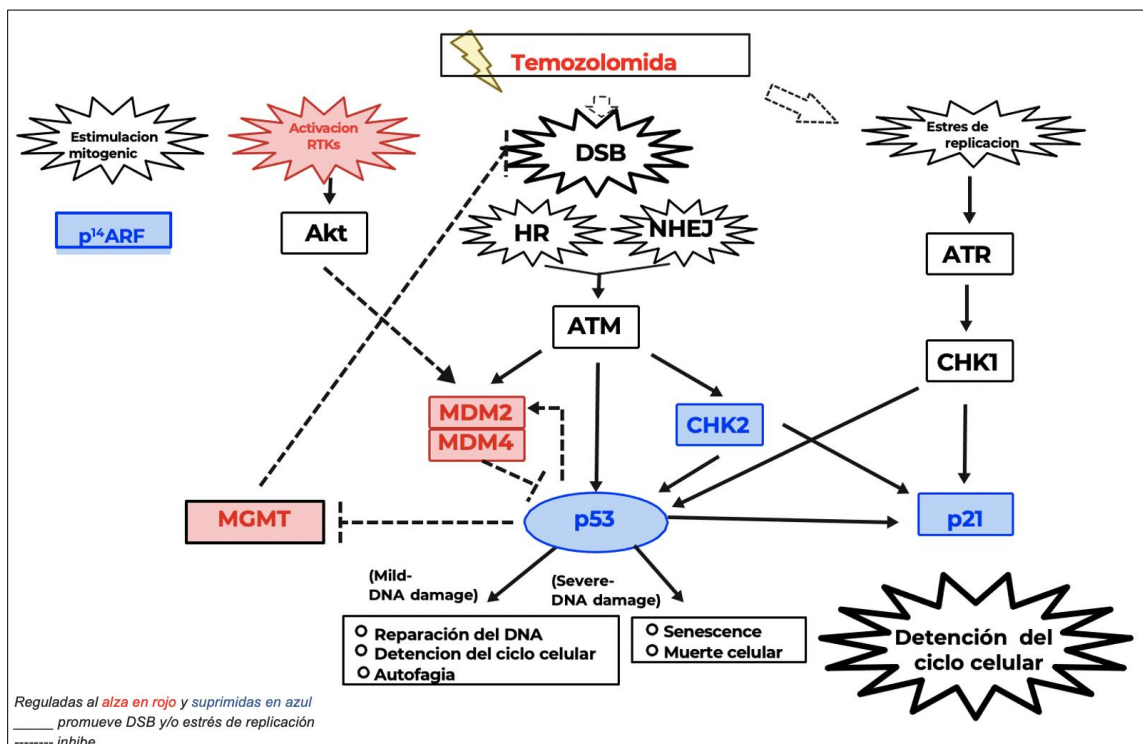


Figura 18. DSB y estrés de replicación en el ADN inducidas por TMZ. Los DSB y el estrés de replicación mediado por TMZ estimulan la activación de DMR. Las DSB activa un proceso que se orchestra a través de una activación secuencial de varias moléculas que desencadenan dos vías: la vía mediada por la proteína

tumoral p53 (ATM-CHK2-p53) y vía ATR-CHK2. Hacen que se presente resistencia a la TMZ el funcionamiento a la baja de p53, CHK2 y p21 ya que no se lograría la detención permanente del ciclo celular.

Fuente: modificado de Ramasamy Paulmurugan, et al. Glioblastoma Resistance to Chemotherapy: Molecular Mechanisms and innovative reversal strategies. Vol 15, 2021, p: 554.

2.4.3.3 Regulación de p53 dependiente de MDM2 inducida por TMZ

MDM2 es una ubiquitina ligasa E3 cuya expresión está regulada positivamente por la señalización de la fosfoinositida-3 quinasa (PI3K)-proteína quinasa B (PKB-Akt). Funciona corriente abajo de la cascada molecular de supervivencia celular mediada por el RTK localizado en la membrana plasmática; se sabe que esta cascada se activa de manera aberrante en las células GB. Como se describió, MDM2 se asocia y antagoniza a p53 mediante una degradación de p53 mediada por ubiquitinación (340). Además, se descubrió una amplificación de MDM2 en casos de GB, especialmente en los casos que albergan p53 no mutado, donde indujo TMZ-R al antagonizar la expresión de p53 (341).

Es importante destacar que la expresión de MDM2 está regulada positivamente por p53, que a su vez bloquea la expresión y las funciones de p53 (343). MDM2 también posee otras funciones que ayudan en la proliferación y supervivencia celular. Otro regulador de p53, MDM4, que es estructuralmente similar a MDM2 y carece de actividad de ubiquitina ligasa, también se expresa mucho en GB, e interactúa con el dominio de unión al ADN de p53 e inhibe la asociación entre p53 y su promotor diana; esto da como resultado la supresión de las funciones de p53. Por último, MDM4 también forma un heterodímero con MDM2 que contribuye a la expresión estable de MDM2 y la degradación de MDM4 (Figura 20) (344).

2.4.3.4 Regulación inducida por TMZ de p21 aguas abajo de p53

La expresión de p21, que induce la detención del ciclo celular y otras respuestas biológicas, está regulada positivamente por la transcripción dependiente de p53 (345). p21 interactúa con cinasas dependientes de ciclina (CDK) para inhibir la interacción ciclina/CDK e inducir la detención del ciclo celular en G2 (efecto farmacológico de la TMZ). De hecho, se informó que la falta de regulación positiva de p21 se asoció con una respuesta deficiente al tratamiento con TMZ en casos de GB (245).

Por otro lado, una expresión aumentada de p21, que induce la detención del ciclo celular constitutivo después del tratamiento con TMZ, podría inducir una supresión efectiva del crecimiento de los GB ((339). Estas pruebas sugieren que la inducción de la expresión de p21 dependiente de p53 después del tratamiento con TMZ puede ser esencial en una adecuada respuesta terapéutica (Figura 20).

2.4.3.5 Regulación mediada por TMZ de la expresión de MGMT aguas abajo de p53

También se conoce el papel clave de p53 en la TMZ-R en células GB a nivel epigenético. La expresión de MGMT está regulada negativamente por p53 en células GB (346). Esto implica que la inactivación de p53 induce la expresión de MGMT y su regulación a la baja contribuye a la resistencia a la TMZ (Figura 20).

2.4.3.6 Regulación de la señalización de muerte celular por TMZ aguas abajo de p53

La activación de p53 por DMR posiblemente induce a la supresión del tumor al desencadenar la detención del ciclo celular y/o la muerte celular (347). Por lo tanto, se considera que la inactivación de p53 por una mutación de TP53 protege a las células tumorales de una detención del ciclo celular mediada por DMR inducida por TMZ o la muerte celular (341).

La activación de p53 provoca la muerte celular a través de una cascada intrínseca dependiente de las mitocondrias y una vía extrínseca mediada por el receptor de muerte. Una regulación al alza transcripcional dependiente de p53 de proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2, como el antagonista/asesino homólogo de Bcl-2, la proteína X asociada a Bcl-2, la proteína 1 inducida por forbol-12-miristato-13-acetato (Noxa) y el modulador de apoptosis regulado al alza por p53 (PUMA) conduce a la unión de p53 a sus promotores génicos o provoca una activación dependiente de p53 de la quinasa c-Jun N0-terminal; en consecuencia, esto desencadena la muerte celular programada intrínseca dependiente de las mitocondrias (348).

Mientras tanto, la regulación positiva transcripcional dependiente de p53 de los receptores de "muerte" que se localizan la membrana plasmática, como el

receptor Fas, el receptor de muerte 5 (DR5) y el efector de apoptosis p53 relacionado con PMP-22, contribuye a una muerte celular programada extrínseca rápida (348).

Las cascadas de muerte celular programada tanto intrínseca como extrínseca inducen la apoptosis dependiente de caspasa y la muerte celular independiente de caspasa, de manera eficaz. En consecuencia, estas múltiples vías de señalización aguas abajo desencadenan una muerte celular programada dependiente de p53 inducida por TMZ. Además, el inhibidor celular de la proteína de apoptosis ligado al X (XIAP), un regulador clave de la señalización de muerte celular programada tanto intrínseca como extrínseca, suprime la activación de las caspasas 3, 7 y 9 al desencadenar su degradación mediada por ubiquitinación. En los GB, se informa que una expresión regulada al alza de XIAP se asocia con casos que muestran un mal pronóstico (349).

Además, el ARNm de XIAP es estabilizado por MDM2 y su expresión es inducida por el factor nuclear kappa B (NFκB) mediado por la vía RTK-PI3K-Akt, y la expresión de MDM2 es inducida por Akt (350). Por lo tanto, esta evidencia sugiere que la señalización de muerte celular intrínseca/extrínseca dependiente de p53 inducida por TMZ en células GB está regulada principalmente a nivel post-mitocondrial a través de un complejo Akt-MDM2-NFκB- y maquinaria mediada por XIAP (Figura 19) (349).

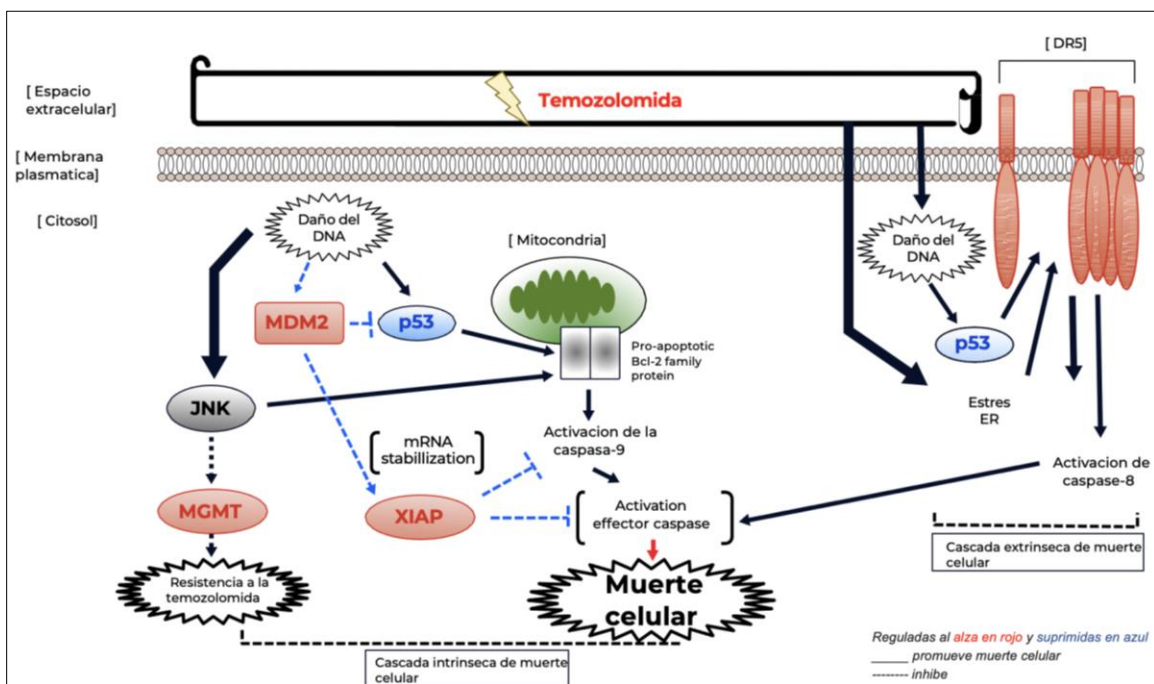


Figura 19. La maquinaria molecular a la muerte celular inducida por TMZ. La activación de p53 provoca la muerte celular a través de una cascada intrínseca

dependiente de las mitocondrias y una vía extrínseca mediada por el receptor de muerte. La función a la baja de p53 o al alza de MDM2, XIAP y MGMT lleva a resistencia a la TMZ.

Fuente: modificado de Ramasamy Paulmurugan, et al. Glioblastoma Resistance to Chemotherapy: Molecular Mechanisms and innovative reversal strategies. Vol 15, 2021, p:556.

2.4.4 RTK y su quimio-resistencia mediada por señalización relacionada

La señalización mediada por RTK es una de las vías de señalización intracelular fundamentales responsables del mantenimiento de la migración, invasión, proliferación y supervivencia celular. De hecho, la activación regulada al alza de la señalización de RTK está implicada en la oncogénesis de varios tipos de cáncer (351). En general, los ligandos de RTK se asocian con el dominio extracelular N0-terminal de sus RTK correspondientes para formar un dímero propio; a esto le sigue la unión de moléculas adaptadoras citosólicas para desencadenar una activación secuencial de la señalización RTK aguas abajo (351). Por otro lado, las mutaciones de activación de los RTK desencadenan la autodimerización o heterodimerización con otros RTK sin asociación con sus correspondientes ligandos; esto da como resultado una activación de RTK independiente del ligando e hipersensibilidad a sus ligandos (352). Además, se sabe que dicha hiperactivación de la señalización relacionada con RTK desencadena quimio-resistencia (351).

Los GB no son una excepción a esto y la primera mutación oncogénica identificada en ellos fue la amplificación de EGFR. Posteriormente, también se identificó la activación mutacional de otros RTK y moléculas aguas abajo y se estudiaron como nuevos objetivos moleculares en la terapia GB (351). Las mutaciones puntuales y las fusiones oncogénicas de los RTK también se han confirmado en los GB mediante avances recientes. Además, la señalización aguas abajo de los RTK está asociada con múltiples vías de señalización disonantes y la señalización no es unidireccional debido a la retroalimentación negativa (344).

2.4.4.1 Quimio-resistencia inducida por activación oncogénica de los RTK

La amplificación de la mutación por truncamiento N0-terminal (dominio extracelular) de la variante III del EGFR (EGFRvIII), se caracteriza por la falta de parte de su dominio extracelular (353). Este mutante de EGFR desencadena el escape de la degradación inducida por la activación a través de una asociación alterada con la E3-ubiquitina ligasa, el linfoma de linaje B de casitas, así como a

través de la activación independiente del ligando (354). Adicionalmente, el TCGA ha revelado múltiples mutaciones puntuales en el dominio extracelular de EGFR en casos de GB (255); sin embargo, los mecanismos subyacentes a la patogenia de estas mutaciones puntuales de EGFR todavía no están bien dilucidados.

Otro RTK frecuentemente mutado en los casos de GB es el receptor A del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFRA). Aproximadamente entre el 10 % y el 13% de los casos de GB albergan esta amplificación y el 40 % de los PDGFRA amplificados se notifican como PDGFRA^{8,9}, que es un mutante por delección de PDGFRA que carece de una parte de su dominio extracelular. Similar a EGFRvIII, el mutante PDGFRA^{8,9} desencadena una activación independiente del ligando y también posee una mayor capacidad de transformación (355). Es importante destacar que la hiperactivación oncogénica del mutante de PDGFRA facilita la secreción extracelular del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), un ligando de PDGFRA; esto forma un bucle anormal de activación de PDGFRA y secreción de PDGF que potencializa aún más la capacidad oncogénica de los mutantes de PDGFRA, incluida su supervivencia celular y quimio-resistencia (355).

El receptor hepatocelular productor de eritropoyetina (receptores Eph) que con las efrinas que son sus ligandos, se han asociado con un mal pronóstico en los casos de GB y con fenotipos indiferenciados de las células madre de GB, estando involucrados en la regulación de la quimio-resistencia (356).

La familia de receptores de dominio de discoidina (DDR), los cuales a diferencia de las otras familias de RTK, generalmente se activan al asociarse con moléculas de la matriz extracelular (ECM), como el colágeno, en los dominios extracelulares N0-terminales para llevar a cabo la señalización de RTK. Entre los DDR, según los datos de TCGA, la expresión de DDR1 es elevada en los casos de GB; por lo tanto, también puede participar en la modulación de la oncogenicidad (357).

Otros RTK hiperactivos, asociados con GB, cuyas formas amplificadas ocurren con frecuencias más bajas son: el receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGFR/c-MET), que se encuentra tanto en las células de GB como las células endoteliales vasculares intratumorales donde forman un bucle autocrino (358). Las familias de receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR) (359). El RTK Tyro-3, Axl y Mer (TAM) miembro de la familia RTK AXL (AXL), ERBB3 y c-Kit (360).

El factor de crecimiento humano 3 (ERBB3) catalíticamente inactivo solo puede servir como socio activador del dominio quinasa en un heterodímero en asocio con ERBB2 (Her2) (361). Esto pone el foco en su dominio de cola carboxilo terminal subsecuentemente transactivado, que se une al dominio SH2 de las tres subunidades reguladoras del fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) (362).

El protooncogén *KIT*, transcribe el receptor homólogo del sarcoma viral felino v-kit, también denominado CD117 (c-Kit) y con su unión al ligando fisiológico, se produce la dimerización, lo que conduce a la transfosforilación, lo que a su vez reorienta el dominio yuxtamembrana, liberándolo de su conformación autoinhibitoria que adquiere en estado inactivo, facilitando su función catalítica (363).

Como ocurre con los receptores anteriores, algunos de estos sitios de fosforilación en la región yuxtamembrana de c-Kit, se unen con dominios SH2, formando sitios de acoplamiento para la señalización y activando vías como, PI3K-Akt-TSC1/2-mTOR1/2; Ras-MAPK y JAK-STAT, que en última instancia activan factores de transcripción para dar origen a la proteína que determinara determinada característica celular (364). En condiciones fisiológicas, el estímulo del factor de crecimiento, en este caso neuregulina para ERBB3 (365) y el factor de células madre para c-kit (366), fosforilan quinasa específicas que conforman PI3K mediante la asociación secuencial con moléculas adaptadoras, para continuar la cascada aguas abajo (367).

Aunque se han descubierto múltiples RTK con activación oncogénica aumentada en GB, la mayoría de los ensayos clínicos dirigidos a estos RTK han fallado. Esto probablemente se deba a que la señalización aguas abajo de los RTK es común y no unidireccional debido a la retroalimentación negativa (21).

2.4.4.2 Receptores ERBB3 y c-Kit

ERBB3: el descubrimiento de mutaciones somáticas activadoras en oncogenes ha permitido importantes avances en el tratamiento de varios tipos de cáncer. La familia ERBB de tirosina quinasa receptoras transmembrana comprende cuatro miembros, EGFR (ERBB1), ERBB2 (HER2), ERBB3 (HER3) y ERBB4 (HER4), y está implicada en la proliferación, diferenciación y migración celular. ERBB3, fue descubierto en 1989 como un homólogo de EGFR y HER2, que ya eran oncogenes conocidos. Aunque el papel crítico de HER3 se ha demostrado claramente la transformación y proliferación de muchos tipos de cáncer hay pocos

datos disponibles sobre los efectos funcionales de las mutaciones de *ERBB3*. A diferencia de las mutaciones activadoras de *EGFR*, actualmente no existe ningún ensayo clínico a gran escala que valide una estrategia de tratamiento específica para los tumores mutantes *ERBB3* (368).

Al igual que los otros miembros de la familia, *ERBB3* codifica un receptor de tirosina quinasa transmembrana (RTK), constituido por un dominio extracelular, un dominio transmembrana único y un dominio intracelular que contiene el dominio tirosina quinasa y un regulador C-terminal. El dominio extracelular está formado por dos regiones de unión a ligandos y dos regiones ricas en cisteína. En ausencia de un ligando, el dominio extracelular permanece en una conformación atada y bloqueada, estabilizada por las interacciones entre las dos regiones ricas en cisteína y evitando su dimerización. Aunque el dominio de tirosina quinasa de *HER3* comparte homología con *EGFR* y el dominio quinasa de *HER2*, se ha demostrado que tiene una actividad de proteína quinasa alterada. Por lo tanto, la activación de *HER3* requiere la formación de heterodímeros con otros receptores de la familia *EGFR* (principalmente *HER2* y *EGFR*) (369).

Los ligandos de *HER3* conocidos son las neuroregulinas *NRG1* y *NRG2*, siendo *NRG1β* la más activa. La parte C-terminal del RTK de *HER3* (lóbulo C, "donante") interactúa con la parte N-terminal del otro RTK (lóbulo N, "aceptor"), lo que lleva a la transfosforilación de *HER3*. Las colas C-terminales fosforiladas de ambos monómeros pueden entonces reclutar proteínas adaptadoras para activar vías de señalización. La señal continúa aguas abajo, a través de dos vías, la vía de la proteína quinasa activada por mitógenos (*MAPK*) y la vía del fosfatidilinositol 3-quinasa (*PI3K*) (208).

La señalización por parte de los dímeros de la familia *EGFR* requiere el reclutamiento de proteínas adaptadoras por residuos de tirosina fosforilados en la región del regulador C terminal de cada monómero. Tanto *HER2* como *EGFR* pueden activar la vía *PI3K* con los adaptadores *GRB2* y *GAB1* y la vía *RAS/MAPK* con los adaptadores *GRB2* y *SHC*, pero *HER3* (y *HER4*) también pueden unirse directamente a la subunidad reguladora *p85* de *PI3K* para activar su ruta. La señalización de los dímeros *EGFR/HER3* y *HER2/HER3* puede diferir, porque *EGFR* puede activar *PLCγ1* y *STAT5*, que también están implicados en la proliferación y la supervivencia. Sin embargo, se ha demostrado que el dímero *HER2/HER3* tiene un potencial oncogénico superior en comparación con otros dímeros que contienen *HER3* (370).

Por lo tanto, HER3 está implicado fisiológicamente en la división y supervivencia celular, y se ha demostrado que su expresión es importante para la proliferación celular en muchos modelos tumorales, así como para el crecimiento y la transformación de tejidos normales. Además, varios estudios han demostrado su papel en la resistencia a terapias dirigidas a otros miembros de la familia EGFR, o inhibidores de PI3K (371).

c-Kit: los seres humanos tienen 58 tirosina quinasas receptoras conocidas, clasificadas en 20 subfamilias. Uno de los miembros destacados de esta familia es c-Kit, también conocido como receptor del factor de crecimiento de células madre. Es uno de los receptores de tirosina quinasa de tipo III y se sabe que desempeña un papel fundamental en la aparición y proliferación del cáncer. Es un receptor de superficie celular bien conocido que se une a su ligando fisiológico, el factor de células madre (SCF), también conocido como ligando c-Kit, lo que lleva a varias funciones fisiológicas.

En condiciones normales, la activación de c-Kit ocurre a través de la unión de SCF, lo que conduce a la homodimerización del receptor, lo que resulta en una serie de eventos involucrando transfosforilación, interacciones autoinhibitorias y activación de múltiples efectoras aguas abajo. Aunque el resultado general de la activación de c-Kit depende de la naturaleza de la célula involucrada, se ha informado que se activan varias biomoléculas efectoras, como MAP quinasas, quinasas de la familia Src, subunidad p85 de PI3K y fosfolipasa C-gamma (372).

2.4.4.3 Señalización RTK-Ras-MAPK

La cascada RTK-Ras-MAPK es una de las vías moleculares esenciales implicadas en el mantenimiento de funciones celulares como diferenciación, migración, invasión, proliferación y supervivencia. Esta cascada se desencadena inicialmente por la asociación de proteínas adaptadoras, como la proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento (GRB2) o el sustrato del receptor de insulina 1 (IRS-1); a esto le sigue la activación de una Ras-GTPase hijo de sevenless (SOS), que posteriormente convierte las pequeñas subfamilias GTPase Ras inactivas unidas a GDP (H-Ras, K-Ras y N-Ras) en formas activas unidas a GTP (373).

Las subfamilias Ras activadas posteriormente inducen la dimerización y fosforilación (activación) de la serina/treonina quinasa conocida como fibrosarcoma rápidamente acelerado (RAF; A-Raf, B-Raf y C-Raf) al interactuar con su dominio regulador N-terminal. Tras la activación, RAF fosforila la

serina/treonina cinasas de especificidad dual corriente abajo, esto es, la proteína cinasa activada por mitógeno 1/2 (MEK1/2); estos posteriormente fosforilan y activan la proteína quinasa activada por mitógenos 3/1 (ERK1/2) (374). En última instancia, el ERK1/2 activado activa los factores de transcripción por fosforilación y se traslada al núcleo desde el citosol para regular funciones celulares importantes mediante la regulación de la expresión génica (Figura 22) (375).

2.4.4.4 La quimio-resistencia inducida por la activación oncogénica RTK-Ras-MAPK

La mutación puntual del gen BRAF oncogénico (que codifica B-Raf), BRAF^{V600E} o la fusión KIAA1549-BRAF (los productos se activan constitutivamente sin asociación con Ras) se descubren a una tasa relativamente alta (20%) en GB pediátricos y raramente en los adultos (1%-3%) (376). Se puede presentar resistencia a los inhibidores BRAF posiblemente por una activación mejorada de ERK1/2 a través de la interrupción de múltiples bucles de retroalimentación negativa, como ERK1/2-EGFR, ERK1/2-BRAF, ERK1/2-MEK1 y ERK1/2-fosfatasa de doble especificidad (377). Un cotratamiento con el inhibidor de ERK1/2 es eficaz para superar esta resistencia (377).

Por otro lado, la neurofibromina 1 (NF1), una proteína activadora de GTPasa que regula negativamente Ras está altamente mutada y, por lo tanto, regulada negativamente en los GB (aproximadamente 20%) (255). Por lo tanto, el NF1 mutado en GB activa la vía Ras-MAPK indirectamente y esta activación acelera la oncogenicidad, supervivencia y quimio-resistencia de GB (Figura 20) (378).

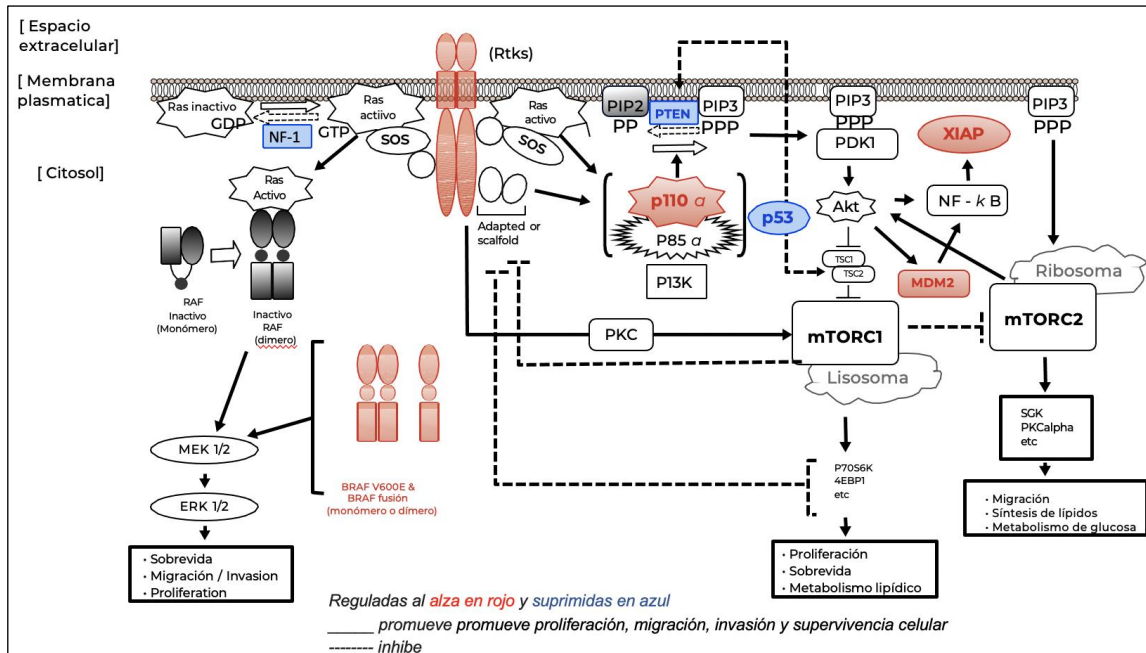


Figura 20. La Regulación vías RTK-PI3K-Akt–mTORC1 y RTK-PI3K-mTORC2 Llevan a resistencia a la TMZ la función a la baja de NF-1, p53 y PTEN, que revierte el paso de PIP2 en PIP3 o la función al alza de los RTK: p110a, XIAP, MDM2 o BRAF.

Fuente: modificado de Ramasamy Paulmurugan, et al. Glioblastoma Resistance to Chemotherapy: Molecular Mechanisms and innovative reversal strategies. Vol 15, 2021, p: 561.

2.4.4.5 Vías de señalización PAM: RTK-PI3K-Akt–mTORC1 (RTK-PKC-mTORC1) y RTK-PI3K-mTORC2

Las vías RTK-PI3K-Akt–mTOR y RTK-PKC-mTOR también juegan un papel crucial en la regulación de la biología celular. Los RTK activados fosforilan PI3K mediante una asociación secuencial con moléculas adaptadoras o andamios (cascada GRB2-SOS-Ras); la PI3K activada fosforila y convierte el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2) en fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) localizado en la superficie interna de la membrana plasmática (379).

Luego, PIP3 recluta serina/treonina quinasa 3-fosfoinosítido proteína quinasa-1 dependiente (PDK1) y serina/treonina quinasa Akt en la membrana plasmática, lo que resulta en una activación de Akt mediada por fosforilación por PDK1 (380). A continuación, la Akt activada fosforila e inactiva el complejo esclerotic tuberosa 1 (TSC1, hamartina)-esclerotic tuberosa 2 (TSC2, tuberina); esto finalmente activa el objetivo de los mamíferos del complejo de rapamicina 1 (mTORC1) al inhibir la supresión de mTORC1 mediada por el homólogo Ras de la proteína de unión a

GTP enriquecida en el cerebro (RHEB) (381). Este complejo es ampliamente reconocido como un regulador de la síntesis de proteínas y lípidos. Posteriormente, estos eventos dan como resultado la regulación de la supervivencia celular y el metabolismo energético intracelular/estado redox (Figura 22).

Otra vía fundamental regulada por la vía RTK-PI3K es la cascada RTK-PI3K-mTORC2. La unión de mTORC2 a los ribosomas de una manera dependiente de PIP3 tras la activación de los RTK y activa las quinasas de la subfamilia AGC (Akt, quinasas inducidas por glucocorticoides y suero, y PKC), lo que da como resultado la supervivencia y migración celular (382). Además, mTORC2 facilita el metabolismo de la glucosa y los lípidos al regular los factores de transcripción c-Myc y la proteína de unión al elemento regulador de esteroides en los GB (367). Durante la comunicación cruzada con mTORC1, p70S6K (un objetivo corriente abajo de mTORC1) fosforila al compañero insensible a la rapamicina del objetivo de la rapamicina en los mamíferos, es decir, RICTOR, un componente de mTORC2, y suprime su función (381).

Además, un informe reciente reveló que los RTK pueden activar mTORC1 a través de la vía alternativa dependiente de PKC sin activar la señalización de PI3K-Akt (383). De hecho, p70S6K regula IRS-1 por fosforilación y, por lo tanto, suprime la señalización de RTK inmediatamente después de la activación de RTK (367). En conjunto, estos hallazgos implican que las vías de señalización intracelular relacionadas con mTORC1 y mTORC2 mediadas por RTK están reguladas por un mecanismo muy complejo que incluye un circuito de retroalimentación negativa o de derivación (Figura 22).

2.4.4.6 Fosfoinositol 3-quinisas

Un posible biomarcador son las mutaciones que truncan la acción del grupo de enzimas denominadas quinasas de lípidos que conforman las fosfoinositol 3-quinisas (PIK3), encargadas de fosforilar los fosfolípidos de inositol (PI) (384).

Los PI derivan de los fosfoglicéridos, que están compuestos por una molécula de glicerol y un grupo fosfato unido a un alcohol o un aminoalcohol, siendo los principales constituyentes lipídicos de la membrana celular (385). Los PI se concentran en la superficie citosólica y tienen un papel importante en la señalización celular (379). Los PI pueden fosforilarse a través de quinasas específicas y de forma selectiva en las posiciones 3, 4 y 5 y se generan siete proteínas únicas, de las cuales tres son monofosfatos, tres bifosfatos y un

trifosfato. Los monofosfatos son el fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P), el fosfatidilinositol 4-fosfato (PI4P) y el fosfatidilinositol 5-fosfato (PI5P). Los bifosfatos son el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato [PI (4,5) P2] o PIP2, el fosfatidilinositol 3,5-bifosfato [PI (3,5) P2] y el fosfatidilinositol 3,4-bifosfato [PI (3,4) P2]. El trifosfato es el fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato [PI(3,4,5) P3] o PIP3 (386).

A su vez, existe un grupo de enzimas denominadas PI3K (387), cuyas funciones son fosforilar el grupo hidroxilo de la posición 3' del anillo de inositol de los PI en la membrana plasmática y generar segundos mensajeros como los ya mencionados PIP2 y PIP3 (388). Se conocen actualmente tres diferentes clases de PI3K, que a su vez se dividen en subclases, según su afinidad por algunos sustratos, su homología y las funciones que cumplen.

La clase I es el grupo de enzimas mejor caracterizada debido a que están implicadas en la patogénesis del cáncer y sus PI3K se dividen en subclase IA y IB (389). Los genes que las producen son: subclase IA catalítica el *PIK3CA* (*p110 α*), *PIK3CB* (*p110 β*) y *PIK3CD* (*p110 δ*) y regulatoria *PIK3R1* (*p85 α* , *p55 α* , *p50 α*), *PIK3R2* (*p85 β*) y *PIK3R3* (*p55 γ*). Subclase IB catalítica *PIK3CG* (*p110 γ*) y regulatoria *PIK3R5* (*p101*), *p84*, *PIK3R6* (*p87PIKAP*). La clase II catalítica incluye *PIK3C2A*, *PIK3C2B* y *PIK3C2G*. Finalmente, solo hay una enzima conocida de subclase III, cuya transcripción está dada por el gen catalítico *VPS34* y regulatorio *PIK3R4* (*p150*) (390). (Figura 21).

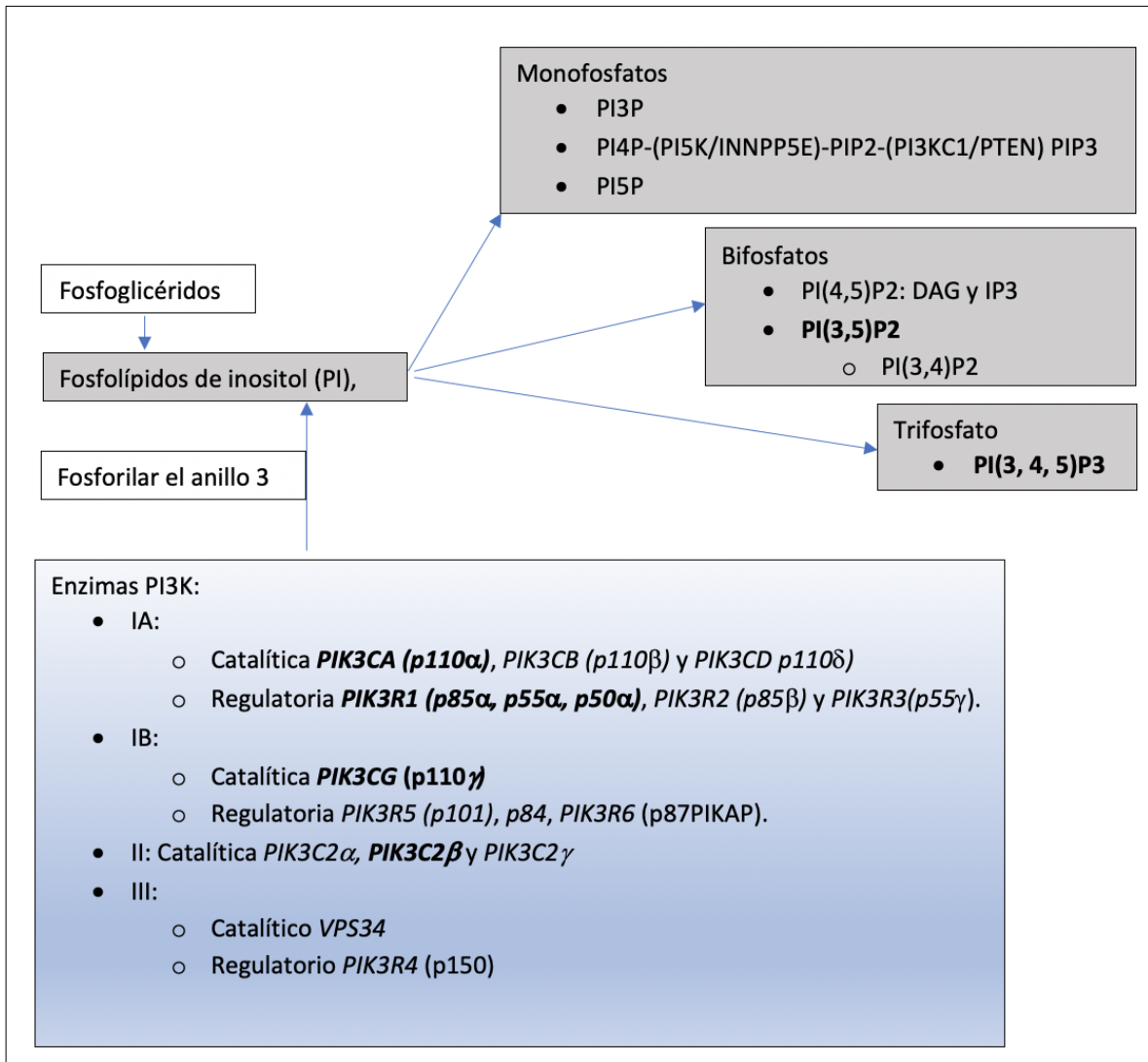


Figura 21. Fosforilación de PIP, a través de quinasas específicas.

La mutación de las enzimas PI3K, como la PIK3C2B activa el paso de PIP 2 a PIP3, activando la vía aguas abajo y llevando a resistencia a la TMZ.

Fuente: elaboración propia

En relación con su localización y función, las enzimas PI3K de clase II y a las que como se anotó pertenecen PIK3C2A y PIK3C2B, estas se encuentran ampliamente distribuidas, especialmente en las organelas y están involucrados en la señalización celular y la respuesta al estímulo con insulina al regular los receptores de transferrina e insulina. PIK3C2A produce PIP3 y juega un papel esencial en la formación de cilios, tráfico de vesículas y migración celular (391,392). La proteína transcrita por *PIK3C2B* regula la de *PIK3C2A* y tiene función dual, ya que puede estimular o reprimir, dependiendo como se programe

(393). El PRE-PIK3C2B endógeno muestra una marca bivalente que tiene H3K27me3 para el estado reprimido y H3K4me3 para el activo (394).

Es posible que PIK3C2B pueda interactuar con PIP2 y formar PIP3 (389). Está involucrada en la migración celular (395), en la activación AKT de las neuronas (396), en la represión de mTORC1, en el reciclaje de IRS1 y en la pinocitosis dependiente de clathrina (397). Este se localiza en la envoltura celular y nuclear estando también vinculada al tráfico vesicular pero además, llevando a la proliferación celular y en la membrana plasmática controlando la actividad de los canales de calcio en las células inmunes (398).

El otro componente de las PIK3 clase II, la PIK3C2G se expresa en glándulas exocrinas como el hígado, el páncreas, mama, próstata e intestino delgado donde juegan un papel importante en la regeneración de los tejidos. En GB se ha descrito la amplificación de *PIK3C2B* (399), asociada a MDM4 por amplificación 1q32.1, y que corresponde a un 7.7% de las amplificaciones detectadas (400). Diferentes estudios relacionaron la mutación de *PIK3C2B* con el desarrollo de otras neoplasias (401), la migración de células cancerosas, transición epitelio-mesénquimal (402), promover la invasión (403), metástasis (404), y resistencia a cisplatino (405), docetaxel (406) y a erlotinib en los pacientes que tienen mutación del EGFR (407).

Esta enzima esta también posiblemente involucrada en la resistencia a la TMZ, a través de la vía RTK-PI3K-Akt-mTOR1/2, denominada PAM (408). En PAM, la interacción de señales extracelulares como factores de crecimiento, citoquinas y hormonas entre otros con un RTK de los que hacen parte ERBB3 y c-kit, induce a su dimerización y producción de cambios conformacionales a partir de la fosforilación de los residuos de tirosina en las regiones citoplasmáticas (185). Estos cambios en el dominio citoplasmático del RTK permiten el reclutamiento secuencial de proteínas adaptadoras (IRS1-2, SHC, GRB2 y GAB2), las cuales llevan a la activación alostérica de las enzimas PI3K (384).

A nivel molecular, la fosforilación de la subunidad p85 que depende de *PIK3R1* (*p85 α* , *p55 α* , *p50 α*), *PIK3R2* (*p85 β*) y *PIK3R3*(*p55 γ*), permite un cambio conformacional que expone el dominio con actividad catalítica de la proteína p110 que es transducción de *PIK3CA* (*p110 α*), *PIK3CB* (*p110 β*) y *PIK3CD* (*p110 δ*); en consecuencia, un grupo fosfato se agrega a PIP2 y lo transforma en PIP3 que recluta 3-fosfoinositido dependiente proteína quinasa-1 (PDK1), la cual fosforila Akt-mTOR y sucesivamente las proteínas citoplasmáticas que conforman esta vía

(409), hasta terminar a nivel nuclear en el complejo proteico NFκB que activa la transcripción de gen de resistencia a múltiples drogas (*MDR1*) (185) (Figura 22).

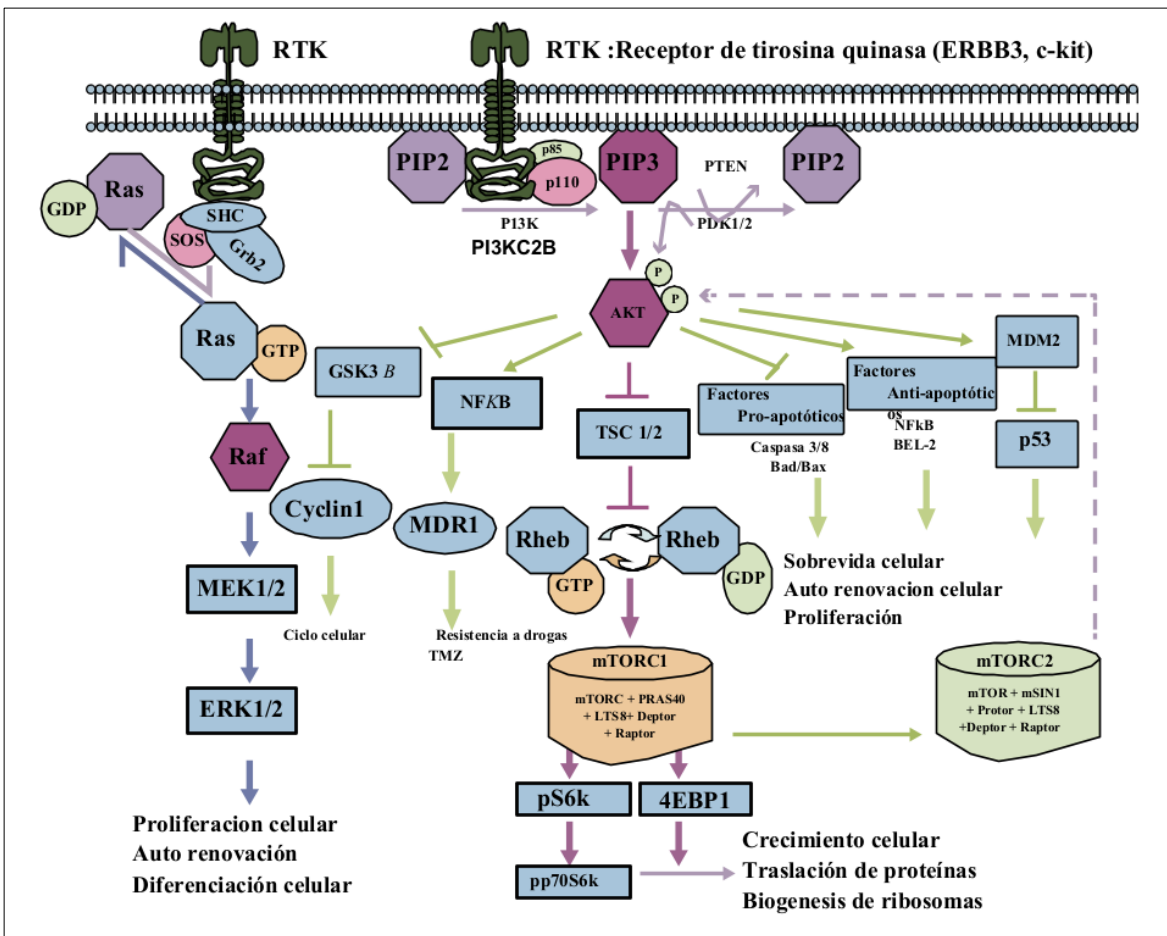


Figura 22. Vía RTK-PI3K-AKT- NFκB-MDR1, que lleva a resistencia. La sobre activación de ciertos RTK como ERBB3 y c-kit o de ciertas enzimas PI3K como PI3KC2B que fomentan el paso de PIP 2 a PIP3, activan la vía AKT-factor de transcripción NFκB que a su vez activa el factor de resistencia a múltiples drogas 1 (*MDR1*), dentro de ellas, la TMZ.

Fuente: modificado de Annovazzi L, Mellai M, Schiffer D. Chemotherapeutic drugs: DNA damage and repair in glioblastoma. *Cancers (Basel)* 2017; 9: 57.

2.4.4.7 Quimio-resistencia RTK-Akt-mTORC1 y RTK-PI3K-mTORC2

En la vía RTK-PI3K-Akt-mTOR, el 18% de los GB tienen mutación somática de los genes para las enzimas de clase IA catalítica *PIK3CA* y regulatoria *PIK3R1*, que codifican la subunidad p85α y la subunidad p110α de PI3K respectivamente (389). La mayoría de las mutaciones de *PIK3CA* y *PIK3R1* se encuentran con frecuencia

en el dominio requerido para la interacción de la subunidad p85 α con la subunidad p110 α (410). La inhibición de la actividad de la subunidad p110 α por parte de la subunidad p85 α se pierde y los mutantes de PI3K se vuelven constitutivamente activos, lo que da como resultado una actividad sostenida de AKT con las consabidas consecuencias desfosforilación secuencial de proteínas citoplasmáticas hasta llegar al núcleo a activar factor de transcripción (411).

Además, el homólogo de tensina fosfatasa (PTEN), una fosfatasa de doble especificidad que desfosforila PIP3 y regula a la baja la función de PI3K, se elimina con frecuencia en los gliomas junto con una pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 10, ocurrencia que es mutuamente excluyente con mutaciones *PIK3CA* y *PIK3R1*(390).

PIK3CA: esta mutación es la más frecuente en cáncer y varios estudios demuestran su papel en la agresividad de los gliomas y la resistencia a la TMZ (412). En líneas celulares de GB la abundancia diferencial de ARNm de *AKT1*, *PTEN*, *PIK3CA* que controla el metabolismo, la salida de fármacos, el transporte de nutrientes y el control epigenético MDM2 son potencialmente críticos para dar forma a los efectos de metilación del ADN de la TMZ y proporciona una nueva perspectiva sobre el efecto combinado de estos factores que conducen a la resistencia a la TMZ (412).

La proteína con motivo tripartito TRIM24 (que contiene el motivo tripartito 24) desempeña distintas funciones en el desarrollo y la progresión en gliomas. La expresión de TRIM24 se correlaciona positivamente con la malignidad del glioma y se asocia negativamente con el pronóstico de los pacientes con GB recién diagnosticado. TRIM24 se une al promotor *PIK3CA* a través de su dominio PHD-Bromo para activar la transcripción del gen *PIK3CA*, mejorando así la señalización PI3K/Akt.

El inhibidor pan-PI3K LY294002 y el ARN de interferencia pequeño dirigido a *PIK3CA* anulan el efecto promotor del crecimiento de TRIM24. Además, TRIM24 regula la expresión de *MGMT* a través de la transducción de señalización de PI3K/Akt/NF κ B, estando involucrado en la resistencia a la TMZ. Finalmente, los pacientes con GB con baja expresión de TRIM24 se benefician de QT, mientras que aquellos con alta expresión de TRIM24 no tienen tal beneficio (413). El reordenamiento genético lleva a la transcripción de fusión *PTPRZ1-MET* (ZM).

Los GB que albergan la mutación ZM mostraron una expresión más alta de los genes necesarios para la señalización de *PIK3CA* y una expresión más baja de los

genes que suprimían la función RB1 o TP53. La expresión exógena de la fusión ZM en la línea de GB U87MG mejoró la migración e invasión celular. Clínicamente, los pacientes afectados por GB que albergan fusión ZM sobrevivieron pobremente en comparación con aquellos afectados por GB que no albergan ZM ($P < 0,001$) (414). El orotato de carboxyamidotriazol (CTO) es un nuevo inhibidor oral de los canales de calcio no dependientes de voltaje con efectos moduladores en múltiples vías de señalización celular y efectos sinérgicos con TMZ.

La secuenciación de genes reveló una alta tasa de respuestas entre los tumores con amplificación de *EGFR* ($P = 0,005$), con mecanismos de resistencia adquirida que posiblemente involucran mutaciones en los genes de reparación de errores de emparejamiento y/o componentes posteriores *TSC2*, *NF1*, *NF2*, *PTEN* y *PIK3CA*. En este estudio se concluye que la OTC se puede combinar de forma segura con TMZ o quimio-radiación en GB y gliomas anaplásicos, mostrando una penetración cerebral favorable y señales prometedoras de actividad en esta población difícil de tratar (415).

Como se ha analizado, la vía de señalización de PI3K/AKT/PTEN está frecuentemente desregulada en GB y está relacionada con la regulación del ciclo celular, la apoptosis y la autofagia. Se evaluó el efecto del ARN pequeño de interferencia (siARN) dirigido a los genes *AKT3* y *PIK3CA* sobre la susceptibilidad de las células T98G a la TMZ y BCNU. La transfección de células T98G con siARN *AKT3* o *PIK3CA* y la exposición a TMZ y BCNU dieron lugar a una reducción significativa de la viabilidad celular, la acumulación de células en fase subG1 y la reducción de células en las fases S y G2/M, así como la inducción de apoptosis o necrosis, y regulación de la autofagia. Se concluye que la eliminación de estos genes en combinación con TMZ y BCNU puede ofrecer una estrategia terapéutica novedosa para controlar de manera más efectiva el crecimiento de las células GB humanas, pero se necesitan más estudios para confirmar un fenómeno positivo para el tratamiento de GB (416).

PIK3R1: en un paciente con GB se identificaron nuevas mutaciones *BRAF* (47-438del) y *PIK3R1* (G376R) mediante secuenciación de ARN. La expresión proteica de *BRAF* y *PIK3R1*, así como la falta de expresión de *EGFR* analizada mediante IHQ, corroboró los datos de secuenciación de ARN. La expresión de marcadores adicionales (AKT, SRC, mTOR, NF- κ B, Ki-67) enfatizó la agresividad del tumor (390).

Varios compuestos (incluidas las antraciclinas) se unieron con mayor afinidad que los fármacos de control como PI-103 y LY-294.002 para PIK3R1) (417). El silenciamiento del gen PPM1D mejora la proliferación celular inducida por TMZ e induce la apoptosis celular y la detención del ciclo celular. Cuando se realizó el silenciamiento del gen PPM1D combinado con TMZ en células de glioma, 367 genes se regularon al alza y 444 genes se regularon a la baja en comparación con el control negativo. La vía de expresión diferencial más significativa fue la vía en el cáncer e IGF1R, PIK3R1, MAPK8 y EP300 son genes centrales en la red. La transferencia Western mostró que los niveles de expresión de las proteínas MAPK8 y PIK3R1 estaban regulados al alza y la expresión de la proteína RB1 estaba disminuida. Era consistente con lo detectado en el perfil de expresión génica. En conclusión, el silenciamiento del gen PPM1D combinado con TMZ erradica las células de glioma a través de la apoptosis celular y la detención del ciclo celular.

La vía PIK3R1/AKT juega un papel en las múltiples funciones de las células de glioma después del silenciamiento de PPM1D y la QT con TMZ (418). Al realizar análisis bioinformáticos y de micromatrices de miARN, se observó que la expresión de 248 miARN estaba alterada, incluidos cinco miARN significativamente regulados al alza y 17 miARN significativamente regulados a la baja, en células U87MG tratadas con TMZ (418).

Los niveles de expresión de miR-128 fueron más bajos en diferentes células de glioma y se asociaron fuertemente con una supervivencia deficiente. El tratamiento con TMZ aumentó significativamente la expresión de miR-128. TMZ mejoró significativamente la actividad del promotor de miR-128-1 y los niveles de miR-128 regulados transcripcionalmente a través de las vías de la quinasa N-terminal 2/c-Jun de c-Jun (83).

La sobreexpresión y la caída de la expresión de miR-128 afectaron significativamente la viabilidad celular mediada por TMZ y la expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis. Además, la sobreexpresión de miR-128 solo mejoró la muerte apoptótica de las células de glioma a través de la activación de caspasa-3/9, la degradación de la poli-(ADP ribosa) polimerasa, la generación de especies reactivas de oxígeno, la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial y la formación de autofagia no protectora (419) .

Finalmente, se identificó que los miembros clave en la señalización del objetivo de la rapamicina en mamíferos (mTOR), incluidos mTOR, el compañero insensible a la rapamicina de mTOR, el factor de crecimiento similar a la insulina 1 y PIK3R1,

pero no PDK1, eran genes objetivo-directos de miR-128. TMZ inhibió la señalización de mTOR a través de la regulación miR-128. Estos resultados indican que la señalización de mTOR inhibida por miR-128 está involucrada en la citotoxicidad mediada por TMZ (420).

PIK3C2G: el análisis integrado de datos multidimensionales tiene el potencial de desentrañar el mecanismo de iniciación y progresión del tumor. Se logró descifrar la vía que conecta las mutaciones y la información de expresión. En GB se identificaron 4 locus de rasgos cuantitativos de expresión cis (eQTL): TP53, EGFR, NF1 y PIK3C2G; 262 trans eQTL y 26 trans miARN eQTL para mutación somática; 2 cis-eQTL: NRAP y EGFR; 409 trans-eQTL y 27 trans-miARN eQTL para la mutación de pérdida de heterocigosidad (LOH) (421).

FAM72 es una proteína específica de las células madre neurales compuesta por cuatro genes parálogos (FAM72 A-D). Los parálogos de FAM72 se sobre-expresan en las células cancerosas, lo que se correlaciona específicamente con los genes del ciclo celular mitótico ASPM, KIF14, KIF23, CENPE, CEP55, SGO1 y BUB1, lo que contribuye a la formación del centrosoma y del huso mitótico. La correlación de expresión de FAM72 identifica un nuevo conjunto de genes específicos de GB (SCN9A, MXRA5, ADAM29, KDR, LRP1B y PIK3C2G) en la vía de novo de GB primario predestinado como objetivos viables para la terapia (422).

PIK3C2B: es la mutación menos estudiada, pero la que tuvo la mayor relación estadística con la resistencia a la TMZ. Los GB portan con frecuencia mutaciones en el gen supresor de tumores PTEN en 10q23.3. Las propiedades supresoras de tumores de PTEN están estrechamente relacionadas con su efecto inhibitorio sobre la activación de la señalización de proteína quinasa B (Akt) dependiente de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K). En el análisis de 17 genes relacionados con la vía de señalización PI3K/Akt para la alteración genética y la expresión aberrante en una serie de 103 GB se detectó mutación, delección homocigota o pérdida de expresión de PTEN en el 32% de los tumores. Por el contrario, no se encontró ninguna aberración en el gen like-1 del inositol polifosfato fosfatasa (INPPL1), cuyo producto génico también puede contrarrestar la activación de Akt dependiente de PI3K (393).

El análisis de genes que codifican proteínas que pueden activar la vía corriente arriba de Pi3k reveló fracciones variables de tumores con amplificación de EGFR (31%), amplificación de PDGFRA (8%) y amplificación de IRS2 (2%). El gen de la proteína tirosina quinasa 2 (PTK2/FAK1) no se amplificó ni se sobre expresó a

nivel de ARNm. La investigación de tres genes que codifican subunidades catalíticas de Pi3k (PIK3CA, PIK3CD y PIK3C2B) reveló la amplificación de PIK3C2B (1q32) en 6 tumores (6%). Se detectó sobreexpresión de ARNm de PIK3C2B en 4 de estos casos. PIK3CD (1p36.2) y PIK3CA (3q26.3) no se amplificaron, pero el ARNm de PIK3CD se sobre expresó en 6 tumores (6%). Se detectó amplificación y sobreexpresión de AKT1 en un único caso de gliosarcoma (399).

Los genes IRS1, PIK3R1, PIK3R2, AKT2, AKT3, FRAP1 y RPS6KB1 no se amplificaron ni sobre-expresaron en ninguno de los tumores. En conjunto, los datos indican que diferentes genes relacionados con la vía de señalización PI3K/Akt pueden ser anómalos en los GB (399). En un estudio se determinaron las alteraciones del número de copias en todo el genoma usando ilumina Bead Arrays para analizar 22 GB y Digital Karyotyping en 8 líneas celulares de GB y una muestra primaria. Las amplificaciones comunes que se observaron para las 31 muestras fueron GLI/CDK4 (22,6%), MDM2 (12,9%) y PIK3C2B/MDM4 (12,9%). En los 22 tumores GB, EGFR se amplificó en el 22,7% de las biopsias quirúrgicas. La región delecionada en homocigosis más común contenía CDKN2A/CDKN2B (p15 y p16) que se presenta en el 29% de los casos. Estos datos se compilaron y compararon con estudios CGH de matriz publicados de 456 casos de GB (399).

La combinación de los datos de ilumina con estudios publicados arrojó estas tasas de amplificación promedio: EGFR- 35,7%, GLI/CDK4- 13,4%, MDM2- 9,2%, PIK3C2B/MDM4- 7,7% y PDGFRA- 7,7%. El locus CDKN2A/CDKN2B se eliminó en el 46,4% de los casos combinados (400).

2.4.4.8 Señalización RTK-JAK-STAT

Las proteínas de la familia de la tirosina quinasa Janus quinasa (JAK) citosólica (JAK1/2) y el transductor de señales del factor de transcripción y las proteínas de la familia del activador de la transcripción (STAT) (STAT1–5/6A/6B) median el eje de señalización que se activa aguas abajo de los RTK, especialmente aguas abajo de los receptores de citoquinas (un tipo de RTK) (423) Los JAK se unen constitutivamente al dominio citosólico de los RTK y, tras la activación de RTK, se fosforilan (activan) por sus residuos de tirosina y luego fosforilan dominios citosólicos específicos de los RTK (423). A continuación, las JAK activadas fosforilan las STAT en tirosina y las liberan al citosol.

Los STAT liberados forman homodímeros o heterodímeros con otros STAT a través de su dominio de homología 2 SRC (dominio SH2). Luego, los STAT dimerizados se fosforilan aún más en su residuo de serina por ERK1/2 o PKC y en los residuos de tirosina por la tirosina quinasa c-SRC citosólica y se transportan al núcleo (424). Los STAT finalmente se unen a la región promotora de los genes diana e inician la transcripción, lo que da como resultado la migración celular, la proliferación, la supervivencia, la angiogénesis y la inmunosupresión (423).

La señalización aguas abajo de STAT3 se ha identificado recientemente como un regulador crítico de la biología tumoral; los reguladores maestros de la transición epitelial a mesenquimatoso [EMT; dedo de zinc E-box vinculante homeobox 1 (ZEB1), proteína de dedo de zinc SNAI1 (SNAIL), proteína 1 relacionada con torsión (TWIST1)], proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2, otras proteínas inhibitoras de la apoptosis (linfoma de células B extra grande), proteína de diferenciación celular de leucemia mieloide inducida Mcl-1 [(Mcl-1), survivina] y marcadores de células madre cancerosas [grupo de diferenciación 133 (CD133), factor 4 similar a Kruppel], que potencialmente induce quimio-resistencia, son todos regulado transcripcionalmente por STAT3 (295). Por lo tanto, la cascada mediada por RTK-JAK-STAT constituye una diafonía complicada con otros tipos de señalización mediada por RTK. Además, los JAK activados también son capaces de activar la vía mediada por Ras.

2.4.4.9 Quimio-resistencia inducida por activación oncogénica de la señalización RTK-JAK-STAT

La activación mejorada mediada por alteración genética de la vía JAK-STAT es rara en GB (425). Sin embargo, la activación aumentada de la cascada JAK-STAT por los RTK hiperactivados corriente arriba contribuye al aumento de la quimio-resistencia en los GB (426). En GB con resistencia TMZ adquirida, también se ha observado una activación elevada de STAT3. Es importante destacar que la inhibición de la activación de STAT3 resultó en la re-sensibilización de los GB a las quimioterapias (427). Por lo tanto, la vía RTK-JAK-STAT también contribuye a la quimio-resistencia de los GB.

3 HIPÓTESIS

Ho: Los genes mutados asociados con cáncer no tienen un valor pronostico en pacientes con gliomas de alto grado a la segunda recaída.

Ha: Los genes mutados asociados con cáncer si tienen un valor pronostico en pacientes con gliomas de alto grado a la segunda recaída.

4 OBJETIVOS

4.1 *General*

Evaluar los genes mutados asociados con cáncer y su utilidad como factor pronóstico de respuesta en pacientes con glioma de alto grado a la segunda recaída.

4.2 *Específicos*

1. Caracterizar socio demográfica y clínicamente los pacientes incluidos en el estudio.
2. Determinar la relación entre la presencia de los genes mutados y su asociación con la segunda recaída.
3. Evaluar los genes identificados en el perfilamiento genómico exhaustivo que mejor expliquen la segunda recaída.
4. Identificar mediante análisis bioinformáticos el efecto de las mutaciones a nivel estructural y funcional en las proteínas codificadas por los genes mutados asociados con cáncer en pacientes con gliomas de alto grado a la segunda recaída.

5 METODOLOGÍA

5.1 Enfoque metodológico de la investigación

El proyecto está enmarcado en un enfoque metodológico cuantitativo, con una perspectiva epistemológica empírico–analítica. Este método se vale de la verificación empírica como mecanismo para contrastar la percepción, teniendo como fundamentos, aquellos procedimientos que permiten la autocorrección y la objetividad; así mismo es un proceso sistemático, formal y objetivo, que se vale de los datos numéricos para obtener toda la información, que será utilizada para el análisis e interpretación de los hallazgos. Este desarrollo se da a través de un proceso hipotético-deductivo, que se refiere al origen hipotético con base al material empírico recolectado a través de procedimientos de observación y experimentación, los cuales, permiten deducir planteamientos específicos encaminados a responder las hipótesis planteadas en la investigación (30).

Este estudio buscó establecer la relación entre las mutaciones de los 324 genes reportados en el perfilamiento genómico exhaustivo y la segunda recaída luego de haber utilizado TMZ como parte del PS (complemento a la CX inicial) y TMZ a dosis metronómicas a la primera recaída, en pacientes con HGG y con un Karnofsky mayor del 60%, con el fin de determinar su valor pronóstico.

Es importante mencionar que el control que se tiene sobre el diseño facilita la interpretación de las asociaciones como causales. Se efectuó en la ciudad de Medellín el seguimiento inició con el reclutamiento de los pacientes con diagnóstico de glioma de alto grado el 1 de enero de 2019 y culminó su captación el 31 de diciembre de 2020.

5.2 Tipo de estudio

Es un estudio observacional, de cohorte, donde al analizar la relación causa – efecto es posible verificar que la presencia de los genes en las personas con diagnóstico de glioma de alto grado antecede la aparición de la segunda recaída en la cohorte, esto ocurre sin la intervención del investigador. Teniendo en cuenta el principio *temporal* de causalidad, se define como ambispectivo, donde la ocurrencia del evento se registrará durante el seguimiento.

Se pretende dar respuesta al principio de plausibilidad biológica a través de la explicación de la presencia de segunda recaída previa a la presencia de los genes

en los pacientes con diagnóstico de glioma de alto grado; esto controlado por variables confusoras y de interacción, la consistencia del estudio se sustenta en que este fue realizado en personas con diferentes condiciones sociodemográficas, diferentes estilos de vida, entre otras, lo que da coherencia a la ejecución de la investigación. En esta investigación no fue posible dar cumplimiento a los principios causales de relación dosis – respuesta, especificidad y evidencia experimental; debido a que el diseño de cohorte no permite realizar experimentación en seres humanos. Los criterios de causalidad descritos anteriormente permitan catalogar este estudio como analítico (428).

5.3 Población

Población de referencia:

Pacientes con cáncer que acuden al Instituto de Cancerología, Clínica Las Américas-AUNA para manejo con cirugía y/o radioterapia y/o quimioterapia y/o soporte oncológico

Población a estudio:

Pacientes con glioma de alto grado ahora denominados gliomas difusos de tipo adulto que incluye el oligodendroglioma grado 3, el astrocitoma grado 3 y 4 y el glioblastoma multiforme, que pertenecen al instituto de Cancerología de la Clínica Las Américas-AUNA.

5.4 Criterios de elegibilidad

Inclusión:

- Pacientes con una edad mayor o igual a 18 años y menor o igual a 70.
- Pacientes con glioma de alto grado definido por neuropatólogo.
- Que recibieron protocolo Stupp luego de la cirugía inicial.
- A quienes a la primera recaída se les suministro dosis metronómicas de temozolomida.
- Firma del consentimiento informado.

Exclusión:

- Presencia con otras neoplasias malignas diferentes a los tumores primarios del SNC.

5.5 Diseño muestral

Tipos de muestreo:

Se realizó un estudio por invitación abierta; donde fueron incluidos los pacientes que cumplieran con los criterios de inclusión y no cumplieran con los de exclusión y que aceptaron participar en la investigación. Se definió un tiempo de reclutamiento de los participantes de doce (12) meses a partir de la fecha de inicio de recolección.

Cálculo del tamaño de la muestra:

El estudio es por invitación abierta

5.6 Descripción de las variables

Se tuvo en cuenta como variable dependiente, la supervivencia libre de progresión (SLP) a la segunda recaída definido como el tiempo transcurrido desde la cirugía inicial a la segunda recaída y como variables independientes el(los) genes y/o la combinación de ellos, variables sociodemográficas y clínicas.

5.6.1 Tabla de variables

Información clínica: de la historia clínica se extrajeron los siguientes datos: edad, sexo, diagnóstico clínico, diagnóstico imagenológico, resultados de patología, pruebas de biología molecular, tratamiento y desenlaces (Tabla 4).

Tabla 4. Variables sociodemográficas y clínicas

Variable	Definición	Naturaleza	Nivel de medida	Unidad de medida	Categorías o valores
Edad	Edad en años cumplidos del paciente al momento del procedimiento quirúrgico	Cuantitativa	Razón	Años	
Sexo	Condición biológica del paciente	Cualitativa	Nominal Dicotómica	N/A	1. Masculino 2. Femenino
Antecedente LGG	Si al momento del Dx de HGG, ya se tenía el de LGG	Cualitativa	Nominal Dicotómica	N/A	1. Si NO
Fecha del Dx. inicial	Momento en que el médico le da el diagnóstico de tumor cerebral	Cuantitativa	Razón	Días	
Volumen tumoral	Volumen inicial en RM al Dx	Cuantitativa	Razón	cms ²	

Dx						
Fecha CX	Tiempo transcurrido entre la cirugía y el día de ingreso al estudio	Cuantitativa	Razón	Días		
Tipo de resección	Descripción del tipo de resección hecha a la lesión tumoral	Cualitativa	Nominal Politómica	N/A		1. "Debulking" 2. Parcial 3. Biopsia
Patología HE OMS (1)	Patología inicial por HE (grado)	Cualitativa	Nominal Politómica	N/A		1. I 2. II 3. III 4. IV
Fecha inicio concomitancia	Tiempo de la Cx al inicio de la TMZ y RT	Cuantitativa	Razón	Días		
Numero de ciclos adyuvancia	Numero de ciclos que recibe el paciente de Adyuvancia	Cuantitativa	Razón			
Tiempo entre el diagnóstico y la recaída	Fecha en que se observa en la resonancia la recaída	Cuantitativa	Razón	Días		
Tiempo entre el diagnóstico y la muerte	Fecha de muerte declarada por certificado de defunción	Cuantitativa	Razón	Días		

Recolección de muestras para análisis de biología molecular: se utilizarán muestras de tejido cerebral canceroso incrustado en bloques de parafina o muestras de biopsias líquidas para realizar la extracción de ADN, la secuenciación de nueva generación y el perfil genético de los pacientes (Tabla 5).

Tabla 5. Variables experimentales

Variable	Definición	Naturaleza	Nivel de medida	Unidad de medida	Categorías o valores
Hallazgos genómicos	Mutaciones identificadas en la secuenciación	Cualitativa	Nominal politómica		1. SNIP 2. Amplificación 3. Delección 4. Otra
Estado microsatelital		Cualitativa	Nominal dicotómica	%	1. Estable 2. Inestable
Carga mutacional tumoral		Cuantitativa	Razón	Numero de mutaciones	

5.7 Técnicas de recolección de la información

5.7.1 Fuentes de información

Esta investigación utilizó fuentes primarias y secundarias como medio para obtener la información de los pacientes con gliomas de alto grado atendidas en el Instituto de Cancerología de la Clínica las Américas-AUNA.

Fuente primaria:

- La encuesta construida y aplicada por el investigador.
- Los resultados producto de todas las pruebas experimentales, esto es:
 - FoundationONE® CDx
 - FoundationLIQUID® CDx.

La secuenciación genómica se realizó con los paneles FoundationOne®CDx (F1CDx) y FoundationONE® Liquid CDx (F1LCDx), que son una metodología de diagnóstico in vitro basada en la secuenciación de última generación para la detección de mutaciones como sustituciones, inserciones, y alteraciones del número de copias (CNA) en 324 genes. Además, se detectan reordenamientos de genes y huellas dactilares genómicas, incluida la inestabilidad de microsatélites (MSI), la carga mutacional del tumor (TMB) y la pérdida de heterocigosidad (LOH).

Fuente secundaria:

- Historias clínicas.

5.7.2 Instrumentos de recolección de la información

Para la recolección de la información se utilizó un instrumento en Excel construido por el investigador teniendo en cuenta las variables sociodemográficas, clínicas y de perfilamiento genético.

5.7.3 Proceso de obtención de la información

Lo pacientes fueron captados en la consulta de Neuro – Oncología, a partir del listado de consultantes, se revisó quienes cumplieran con los criterios de elegibilidad, y posteriormente fueron contactados vía telefónica por el investigador principal, quien le informó acerca del proyecto de investigación y le explicó el objetivo, los riesgos y los beneficios.

Una vez el paciente aceptaba participar se le programaba una visita al consultorio donde se le hacía entrega del consentimiento informado para su lectura y posterior firma como señal de aceptación para el ingreso en la investigación. Como parte del proceso de recolección de la información, se extrajo la información de las historias clínicas y se solicitó al departamento de patología de la clínica las Américas los bloques de parafina o las muestras de sangre del paciente (biopsia líquida) para la realización de las pruebas propuestas en la investigación (perfilamiento genético exhaustivo).

Posteriormente, se hizo una identificación de las muestras, encontrando que, 26 pacientes contaban con muestras en bloques de parafina almacenadas en el departamento de patología y en cinco pacientes no se tenía este material y se procedió a tomar biopsia líquida (en sangre). La calidad de las muestras de los bloques de parafina se puede asegurar por los protocolos que tiene establecido el departamento de patología para el almacenamiento y conservación de las mismas.

Estas muestras fueron entregadas según el protocolo de manejo de muestras biológicas al laboratorio Gemcell con sede en Bogotá quienes las remitieron a FoundationONE en Bethesda (USA), donde se efectuó todo el proceso de secuenciación de nueva generación, y posteriormente en un lapso de 2 a 3 semanas, los resultados fueron enviados al correo electrónico del investigador leonortizgomez@gmail.com, en un formato preconcebido y que incluyó no solo el informe de los 324 genes si no también los intrones de los 36 genes implicados en los reordenamientos.

5.8 Prueba piloto

Se realizó una prueba piloto con 11 pacientes con otro tipo de neoplasias diferentes a gliomas de alto grado (glioma de bajo grado, cáncer de pulmón, colon y tumores de hipófisis) con el fin de evaluar:

- El proceso de captación del paciente.
- La forma y contenido los instrumentos necesarios para la recolección de información.
- La pertinencia de las variables definidas en el estudio

El tiempo transcurrido entre el envío de la muestra y la recepción de los resultados.

En esta prueba piloto se pudo demostrar que los instrumentos utilizados y los tiempos presupuestados estaban ajustados y no fue necesario realizar ningún cambio sustancial en el mismo.

5.9 Control de errores y sesgos

- **Sesgos de selección**

Para la selección de los participantes se cumplió rigurosamente con los criterios de inclusión y exclusión definidos para este estudio.

- **Sesgos de información**

En este proceso se controlaron los sesgos de información que se pudieran presentar por parte del participante, investigador y del instrumento (429,430). Para ello se realizó prueba piloto para validar los instrumentos a utilizar para la recolección de información.

Instrumento: Para controlar este sesgo el investigador construyó el instrumento basado en las variables definidas para el estudio.

Encuestador: Para controlar el sesgo, el instrumento fue aplicado por el investigador.

Como medida de control, el investigador realizó una revisión aleatoria de las encuestas durante la fase de recolección y posteriormente hizo una valoración al 100% de todas las encuestas aplicadas, en ambos casos tanto en la revisión aleatoria como en la total se verificó el correcto diligenciamiento. Además, se garantizó la confidencialidad de la información aportada por los participantes.

Encuestado: Se le explicó a cada participante la importancia de la veracidad de la información, para ello se hizo énfasis en los posibles beneficios que se podían obtener de esta investigación.

- **Factores de confusión**

Se presentan al estimar la asociación existente entre la variable dependiente en relación a las demás variables, se debe a que estadísticamente pueden presentar una asociación, por tal razón las variables que se deben de ingresar a comparar con la variable de interés deben de estar soportadas en la literatura, este sesgo es muy común dado que los hallazgos toman los efectos de interés de la exposición mas no otros que pueden ser factores de riesgo (431). Se controló en el análisis multivariado, confirmando que ninguna variable incluida en modelo tenía un comportamiento como confusora.

5.10 Técnicas de procesamiento y análisis de datos.

El análisis de los datos se hizo por los objetivos específicos, así:

5.10.1 Caracterizar Socio demográfica y clínicamente los pacientes.

Se realizó un análisis univariado, en el cual para las variables cuantitativas se calcularon medidas de resumen como medias y medianas, con sus respectivas medidas de dispersión ya sea la desviación estándar y el rango inter-cuartil de acuerdo con la distribución de la variable (Prueba de normalidad Shapiro Wilk). Para las variables cualitativas se calcularon frecuencias absolutas y relativas. La presentación de los resultados se hizo a través de tablas, gráficos de barras simples, gráfico de sectores o torta, cajas y bigotes, barras de error, líneas o tendencia.

5.10.2 Determinar la relación entre la presencia de los genes y segunda recaída.

Para el análisis se tuvo en cuenta en los análisis bivariados las pruebas de log rank test, modelos de regresión de Cox simple, con análisis de Kaplan Meyer y curvas de supervivencia. Los resultados fueron presentados en forma de texto, tablas, gráficos de curva de supervivencia.

5.10.3 Evaluar los genes identificados que mejor expliquen la segunda recaída.

Para el modelo multivariado se realizó un modelo múltiple de regresión de Cox. Se tuvo en cuenta el comportamiento del análisis bivariado, es decir, ingresaron al modelo aquellas variables que cumplían con algunos de las siguientes características: Significancia estadística con $p < 0.05$, criterio de Hosmer-Lemeshow con una $p < 0.25$ y por criterio del investigador. El ingreso de las variables fue hacia adelante (una a una) y se hizo análisis de interacción para cada uno de los modelos hasta incluido el modelo final.

Los resultados fueron presentados en forma de texto, tablas, gráficos de curva de supervivencia.

5.10.4 Analizar los genes relacionados con la segunda recaída a partir de bioinformática

Se modeló la estructura tridimensional de las 4 proteínas mutadas relacionadas con la segunda recaída de los pacientes, para determinar el cambio estructural en la proteína e identificar el dominio mutado, con el fin de inferir como se afectaba la estructura y función de la proteína. Adicionalmente, se realizó un análisis de interacción de proteínas para identificar la ruta metabólica afectada y postular un posible mecanismo de resistencia de los genes con respecto al tratamiento.

Las propiedades químicas de las proteínas se identificaron utilizando el servidor web de la herramienta ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>). La identificación de las propiedades químicas de los aminoácidos se realizó mediante el servidor web GPMAW (<https://www.alphalyse.com/customer-support/gpmaw-lite-bioinformatics-tool/start-gpmaw-lite/>) y el servidor web de secuencias de proteínas de color (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_color.html).

El efecto de las mutaciones en las proteínas fue determinado por PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) y SIFT (<http://sift.bii.a-star.edu.sg/>) servidores web. El péptido señal de las proteínas se identificó utilizando el servidor web SignalP-6 (<https://www.ebi.ac.uk/interpro>). Se utilizó el servidor web InterProScan para identificar los dominios, los procesos biológicos, la función molecular y el componente celular de las cuatro proteínas (<https://www.ebi.ac.uk/interpro>).

Posteriormente, utilizando el servidor web String Interaction Network (STRING) y la base de datos Genecards, se identificaron las interacciones y rutas metabólicas en las que participan las proteínas (<https://string-db.org/> y <https://www.genecards.org>). La estructura tridimensional de las proteínas se modeló usando el servidor web Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org>), y el cambio estructural causado por las mutaciones se determinó usando el Swiss-pdb-viewer programa de bioinformática (<http://spdbv.unil.ch>), para establecer cómo se afectaba la

estructura y función de la proteína. Finalmente, todas las enfermedades que se han asociado con mutaciones en los cuatro genes se identificaron utilizando la base de datos OMIM (<https://www.omim.org>).

Los resultados fueron presentados en forma de texto e imágenes tridimensionales

6 CONSIDERACIONES ÉTICAS

El presente trabajo se clasifica con riesgo mínimo, de acuerdo con la Resolución No. 8430 de 1993, sobre la investigación en seres humanos, ya que se tomaron, en caso de no contar con los bloques de parafina, muestras de sangre de los participantes, sin realizar otras intervenciones adicionales. Específicamente, la cantidad de sangre no puso en riesgo a los individuos, ya que la cantidad fueron de 2 tubos pequeños, para un total de aproximadamente 20 mililitros, en el brazo. Es un procedimiento sencillo que no afectará la salud o bienestar de los participantes; sin embargo, se tuvo en cuenta los riesgos como equimosis en el sitio de punción, incomodidades menores como dolor durante la punción, hematomas de pequeño tamaño y/o infección secundaria, riesgo que fue controlado utilizando agujas y material de uso, nuevo y estéril para cada paciente, así como desinfectantes previos a la punción.

Se aplicó un consentimiento informado para la participación en este estudio (Anexo 16.1), el cual fue sometido y aprobado por el Comité de Ética en Investigación en Humanos de la Universidad CES, Acta 122 del 10 de mayo del 2018, con modificación del 24 de noviembre del 2020 (Anexo 2. Aval Ético). Se garantizó la confidencialidad de las muestras y su uso será exclusivamente para las pruebas mencionadas y no para otras técnicas o proyectos no relacionados.

Atendiendo a las buenas prácticas de información para los participantes del estudio, se realizó una reunión con cada persona para explicarle el proyecto previo a la firma del consentimiento, que permitió responder las dudas sobre el tema del proyecto y las implicaciones de sus resultados.

En cuanto a los principios éticos de investigación, el derecho de autonomía se garantizó que todos los participantes del estudio ingresaran de forma libre y voluntaria. Además, se mantuvo y respetó el anonimato de cada paciente reportando los resultados codificados y no individualizados. Por otro lado, no se dieron compensaciones económicas a los pacientes ni a la institución prestadora de servicios por la autorización al uso de los datos.

En lo referente al principio de beneficencia, las divulgaciones de los resultados del proyecto han aportado al conocimiento en el área de farmacoterapia, lo que podrá beneficiar, a corto y mediano plazo, a aquellas personas con gliomas de HGG, ya que se ha identificado un posible biomarcador que permita seleccionar con más certeza los pacientes que se beneficiaran del uso de temozolomida. Sobre el

principio de justicia, todos los pacientes que cumplieran los criterios de inclusión y exclusión se tuvieron en cuenta para hacer parte del estudio.

Finalmente, sobre el principio de no maleficencia, no se causó daño a los participantes ya que la toma de muestra de sangre en caso de necesitarse es un proceso seguro que usualmente no tiene eventos adversos y en la recolección de la información no se preguntaron temas sensibles de la personalidad o la conducta que pudiesen incomodar a los individuos.

Derechos de autor:

Los derechos morales son un conjunto de derechos que tiene el autor que le confiere potestad de reclamar la paternidad sobre su creación y la mención de su nombre cuando la obra se use o describa. Estos derechos son irrenunciables, imprescriptibles, intransferibles, inembargables e inalienables (432). Para este proyecto la propiedad intelectual estará enmarcada dentro de la categoría de derechos de autor dado que los productos que se esperan obtener son obras literarias.

Según el reglamento de propiedad Intelectual de la Universidad CES, este proyecto de investigación - Tesis, es clasificado como compartido o mixto ya que participan además de la Universidad CES otras instituciones como el Instituto de Cancerología de la Clínica Las Américas-AUNA (433).

La titularidad de los derechos morales recaerá sobre el estudiante de Doctorado León Darío Ortiz Gómez. Se respetarán los derechos de propiedad intelectual de terceros cuando se haga uso de herramientas como la citación, el parafraseo y el resumen, las cuales permiten incluir ideas de otros escritores en la producción propia (434). Las obras literarias que se planean generar en este proyecto de Investigación incluyen como mínimo dos artículos científicos, los cuales serán sometidos a revistas indexadas para su publicación, participación en eventos académicos nacionales o internacionales. El Comité Institucional de Ética en investigación en Humanos, proyecto 763, extendió el aval ético del proyecto inicial aprobado en sesión 122 del 08 de mayo de 2018.

7 RESULTADOS

Se realizó un análisis univariado, en el que se calcularon medidas de resumen, incluidas medidas de tendencia central, para las variables cuantitativas, junto con sus respectivas medidas de dispersión, según la distribución de la variable (prueba de Shapiro-Wilk). Para las variables cualitativas se calcularon frecuencias absolutas y relativas. Los resultados se presentaron a través de gráficos y tablas. Para realizar el análisis bivariado se utilizó la prueba de Log-rank, modelos de regresión simple de Cox, análisis de Kaplan-Meier y curvas de supervivencia. Los resultados se presentaron en tablas y un gráfico de curva de supervivencia. Para realizar el modelo multivariante, se realizó un modelo de regresión múltiple de Cox.

Para el ingreso de las variables al modelo final se consideró el comportamiento del análisis bivariado; es decir, se introdujeron en el modelo aquellas variables que cumplían con los siguientes criterios: 130 significancia estadística con $p < 0,05$, criterio de Hosmer Lemeshow con $p < 0,25$, y según los criterios del investigador (plausibilidad biológica). Las variables se introdujeron progresivamente y se realizó análisis de interacción para cada modelo hasta llegar al modelo final, considerando el principio de parsimonia. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando los programas estadísticos STATA 134 (versión 14) y SPSS (versión 28).

7.1 Caracterización socio demográfica y clínica de los pacientes.

La población de estudio estuvo conformada por pacientes oncológicos que acuden al Instituto del Cáncer (Clínica Las Américas-AUNA) para manejo con cirugía, radioterapia, quimioterapia y apoyo oncológico. El estudio se realizó por invitación abierta, reclutando 31 pacientes que cumplían con los siguientes criterios de inclusión: pacientes mayores de 18 años, diagnosticados de tumor cerebral maligno primario, que se sometieron a cirugía de resección tumoral o biopsia, y que debían tener un diagnóstico histológico de HGG.

7.1.1 Características sociodemográficas.

Para el análisis se incluyeron 31 personas con diagnóstico de glioma de alto grado, encontrando que la edad promedio al diagnóstico del glioma de alto grado era de 47 años DS 14,52. En cuanto al género, 11 pacientes eran hombres (35,49%) y 20 mujeres (64,51%). En relación con el estado civil, 67,7 % eran casados, el 22,6% unión libre y el resto solteros. Al indagar sobre su ocupación,

40% estaban dedicados al hogar como amas de casa, 20% al comercio, 20% eran ingenieros y el resto estaban dedicados al área de la salud.

Como puede observarse en la tabla 6, pertenecían al estrato socioeconómico tres el 41,9% y al dos el 19,4%. Residían en el área urbana el 87%. En relación con la afiliación, el 54,8% de los pacientes estaban afiliados a Sura EPS, 16,1% a la Nueva EPS y 12,9% a Coomeva, entidades con las que tiene contrato el Instituto de Cancerología de la Clínica Las Américas-AUNA (Tabla 6).

Tabla 6. Caracterización demográfica de los pacientes. Tabla de variables que permiten la caracterización sociodemográfica en números absolutos, porcentajes, e intervalos de confianza del 95%.

Variables	N	Diferencia de proporciones		
		%	IC 95%)	
			Inferior	Superior
Genero				
Masculino	11	35,5%	18,6%	52,3%
Femenino	20	64,5%	47,7%	81,4%
Estado civil				
Casada/o	21	67,7%	51,3%	84,2%
Unión libre	7	22,6%	7,9%	37,3%
Soltero/a	3	9,7%	-0,7%	20,1%
Nivel económico de la vivienda				
2	6	19,4%	5,4%	33,3%
3	13	41,9%	24,6%	59,3%
4	4	12,9%	1,1%	24,7%
5	5	16,1%	3,2%	29,1%
6	3	9,7%	-0,7%	20,1%
Entidad				
SURA EPS	17	54,8%	37,3%	72,4%
COOMEVA	4	12,9%	1,1%	24,7%
COLSANITAS	1	3,2%	-3,0%	9,4%
NUEVA EPS	5	16,1%	3,2%	29,1%
MEDPLUS	2	6,5%	-2,2%	15,1%
U NACIONAL	1	3,2%	-3,0%	9,4%
ALIANZA	1	3,2%	-3,0%	9,4%

7.1.2 Características clínicas

Tenían antecedentes familiares oncológicos el 16,1% de los pacientes (2 cáncer de próstata, 2 de mama y 1 neurofibromatosis) (Figura 23).

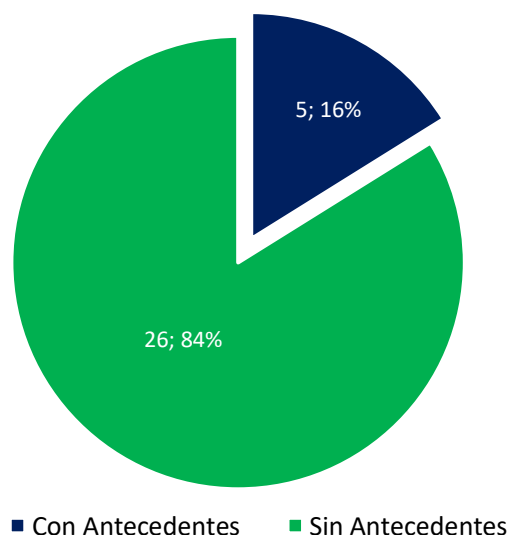


Figura 23. Antecedente de cáncer de los de los pacientes con HGG.

En la figura se observa cómo el 16% (5 pacientes) tenían antecedentes oncológicos).

Para el momento del diagnóstico, tenían un estado de desempeño del *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG) de 0 el 32% de los pacientes, de 1 el 32% y 2 el resto. El índice funcional de Karnofsky al diagnóstico fue de 90 en 35% de los pacientes, de 80 en el 30% y de 70 o menos en el resto.

Sin discriminar por cual hemisferio cerebral lesionado y teniendo en cuenta de que a veces las lesiones no se confinan a un solo lóbulo, el 32% de los pacientes tenían la lesión en el lóbulo frontal, 16% en el parietal, 22% en el temporal, 26% en el occipital. Solo una paciente tenía una lesión ganglio basal.

En todos los pacientes se efectuó resonancia magnética cerebral contrastada preoperatoria. La suma aproximada de los diámetros mayores en centímetros (cms) del tumor fue: 2 cms de diámetro en el 32% de los pacientes; 3 cms en el 25% de los pacientes, 4 cms en el 20% de los pacientes, 5 cms en el 20% de los pacientes. Solo una paciente tenía una lesión mayor de 7 cms.

Se efectuó resección macroscópicamente “completa” (ya definida como de más del 90%) en el 45% de los pacientes y resección parcial o biopsia en el resto.

El reporte de patología, basado en hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica fue que el 68% de los pacientes tenían glioblastoma (GB, 21 pacientes), el 16%

astrocitoma anaplásico (AA, 5 pacientes) y el 16% tumores de origen oligodendrogial (5 pacientes), este último grupo conformado por 4 pacientes con oligoastrocitoma anaplásico (OAA) y un paciente con oligodendroglioma anaplásico (OA) (Figura 24).

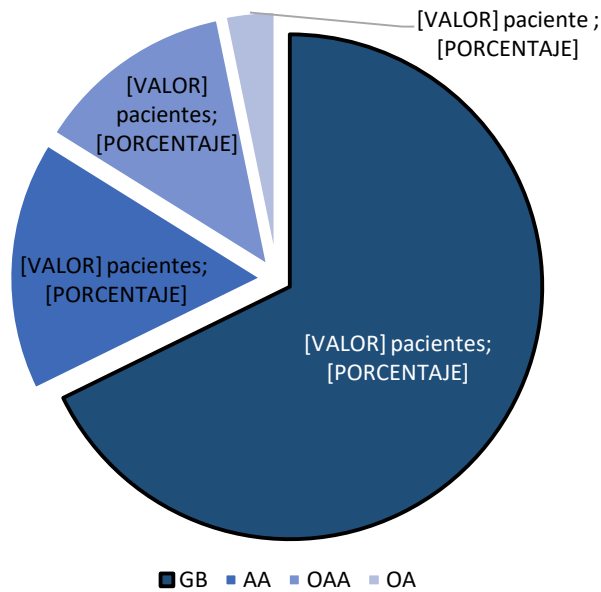


Figura 24. Tipo de tumor de los de los pacientes con HGG. En la figura se muestra la clasificación de los 31 pacientes analizados según el tipo de tumor, según OMS-4ed, 2016: glioblastoma (GB), astrocitoma anaplásico (AA), oligoastrocitoma anaplásico (OAA) y oligodendroglioma anaplásico (OA). El tumor más frecuente fue el glioblastoma con un 68%.

Se efectuó inmunohistoquímica para IDH1 en el 61% de los pacientes (en 19 de 31 los pacientes). Se hizo la prueba en 10 de los 21 pacientes con glioblastoma (47%) estando no mutados (silvestres) en 9 y mutada en 1, en cual cambio el diagnóstico a AA. Se hizo la prueba en 4 de los 5 pacientes con astrocitoma anaplásico, encontrándose que la tenían mutada 4. Se hizo la prueba en 4 de los 5 pacientes con tumores de la estirpe oligodendrogial, encontrándose mutada en todos los pacientes (Tabla 5).

En la muestra de patología a la primera CX, se reportó la codeleción 1p/19q por FISH solo se efecto en cuatro pacientes. En un paciente con AA que a los días del diagnóstico inicial permitió detectar la codeleción y para ese momento cambia el diagnóstico a tumor de origen oligodendrogial. Se buscó y confirmó la codeleción

en tres pacientes con tumores oligodendrogiales (60%), 2 con OAA y uno con OA (Tabla 7).

En el 54,8% (17 pacientes) se hizo la búsqueda de la metilación del promotor para la MGMT. En 10 de 21 de los pacientes con glioblastoma, teniendo metilado el promotor 3 y no metilado 7 de ellos. De los pacientes con astrocitoma anaplásico solo se buscó la metilación en 3 de los 5 pacientes, encontrándose metilada en 2 de ellos. En los pacientes con tumores de la estirpe oligodendrogial se buscó en 4 de ellos (80%) los cuales estaban todos metilados (Tabla 7).

Tabla 7. Consolidado con diagnóstico inicial, basado en H-E, IHQ y FISH. Tabla de los 31 pacientes con el diagnóstico inicial, basado en la OMS-4^a edición del 2016, codeleción 1p/19q, IDH y MGMT

Diagnóstico inicial, según OMS-4ed, 2016				
Paciente Número	Diagnostico	Codeleción 1p/19q (FISH)	Mutación IDH (IHQ)	Metilación del promotor MGMT (PCR)
1	Glioblastoma	No se busca	Silvestre	No metilado
2	Glioblastoma	No se busca	No se busca	No se busca
3	Glioblastoma	No se busca	Silvestre	No metilado
4	Glioblastoma	No se busca	Silvestre	No metilado
5	Glioblastoma	No se busca	No se busca	No se busca
6	Glioblastoma	No se busca	Silvestre	No se busca
7	Glioblastoma	No se busca	Silvestre	No metilado
8	Glioblastoma	No se busca	No se busca	No se busca
9	Glioblastoma	No se busca	No se busca	No metilado
10	Glioblastoma	No se busca	Silvestre	No se busca
11	Glioblastoma	No se busca	No se busca	No metilado
12	Glioblastoma	No se busca	No se busca	No se busca
13	Glioblastoma	No se busca	Silvestre	Metilado
14	Glioblastoma	No se busca	No se busca	No se busca
15	Glioblastoma	No se busca	No se busca	No se busca
16	Glioblastoma	No se busca	Silvestre	Metilado
17	Glioblastoma	No se busca	mutado	Metilado

Diagnóstico inicial, según OMS-4ed, 2016				
Paciente Número	Diagnostico	Codelección 1p/19q (FISH)	Mutación IDH (IHQ)	Metilación del promotor MGMT (PCR)
18	Glioblastoma	No se busca	Silvestre	No metilado
19	Glioblastoma	No se busca	No se busca	No se busca
20	Glioblastoma	No se busca	No se busca	No se busca
21	Glioblastoma	No se busca	No se busca	No se busca
22	Astrocitoma anaplásico	No se busca	mutado	Metilado
23	Astrocitoma anaplásico	No se busca	mutado	No se busca
24	Astrocitoma anaplásico	No se busca	mutado	Metilado
25	Astrocitoma anaplásico	No se busca	No se busca	No metilado
26	Astrocitoma anaplásico	1p/19q+	mutado	No se busca
27	Oligoastrocitoma anaplásico	1p/19q+	mutado	Metilado
28	Oligoastrocitoma anaplásico	No se busca	mutado	No se busca
29	Oligoastrocitoma anaplásico	1p/19q+	mutado	Metilado
30	Oligoastrocitoma anaplásico	No se busca	No se busca	Metilado
31	Oligodendroglioma anaplásico	1p/19q	mutado	Metilado

Entre 4 a 6 semanas luego de la CX, todos los pacientes recibieron el tratamiento concomitante de RT y TMZ, si bien el 50% (15) de los pacientes recibieron los 6 ciclos de adyuvancia, el 13% pacientes recibieron menos ciclos (1 paciente tres ciclos, 2 pacientes dos ciclos y tres pacientes tres ciclos). Acorde a lo que se hace en algunos otros centros oncológicos, y con el criterio clínico e imagenológico, el resto recibieron más de 6 ciclos, alcanzando casi todos ellos el año de tratamiento 9 pacientes (Figura 25).

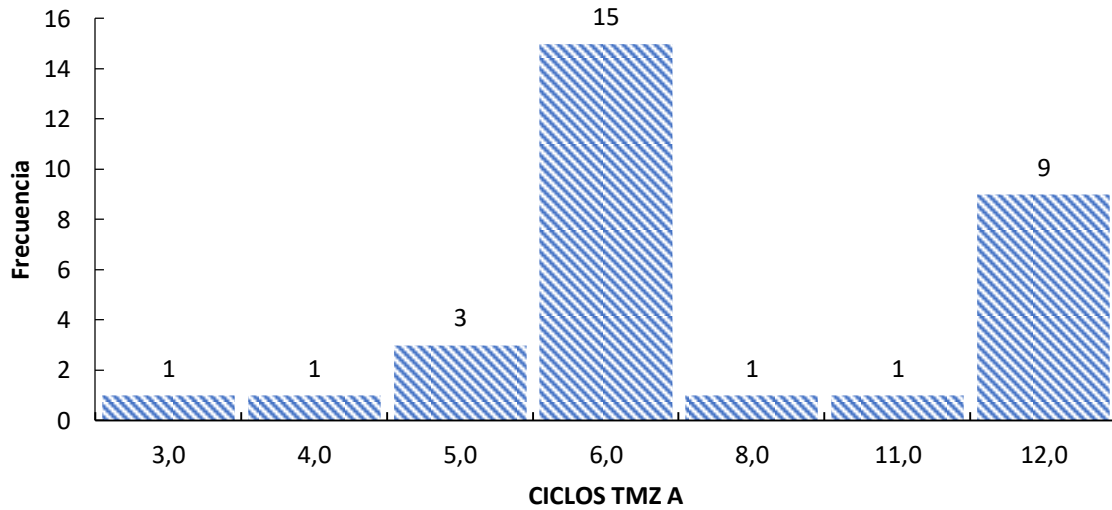


Figura 25. Ciclos TMZ adyuvante de los participantes con HGG. La figura muestra los ciclos de tratamiento con TMZ adyuvante administrados a los 31 pacientes con glioma de alto grado.

Los 31 pacientes se siguieron clínica e imagenológicamente hasta la primera recaída, esto es, luego de haber terminado el PS. En promedio la primera recaída se presentó a los 14 meses, luego de la CX. A la recaída, a todos los pacientes se les suministro TMZ, esquema metronómico, esto es, dosis de 75 mg/mt2 día. Este medicamento se suspendió en los pacientes en los que se lograba remisión clínica e imagenológica o continuo hasta nueva progresión, o sea hasta la segunda recaída.

Como se puede observar en la figura 26, no todos los pacientes recibieron igual número de ciclos de temozolomida metronómica a la primera recaída, ya que el número de ciclos vario entre 2 y 21 ciclos, recibiendo la mayoría 6 ciclos el 32% (10 pacientes).

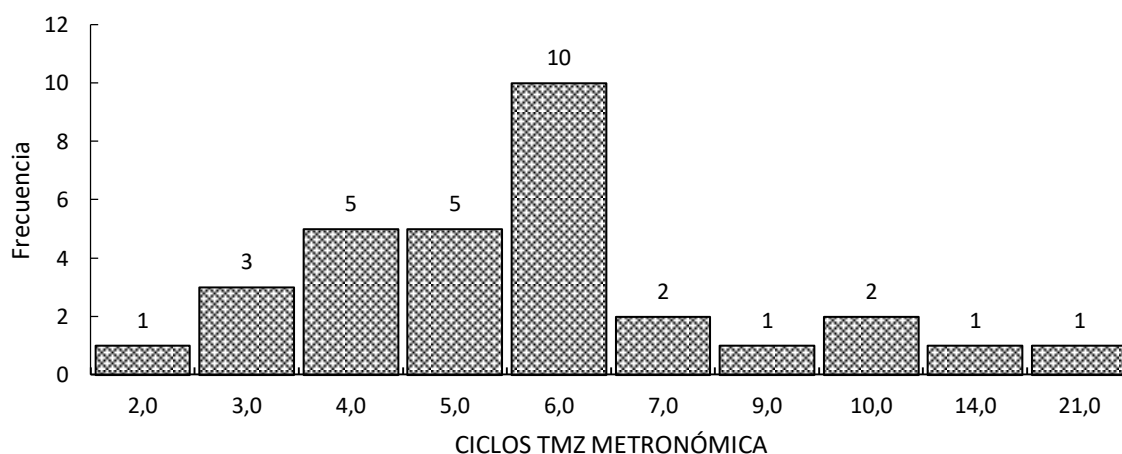


Figura 26. Ciclos TMZ metronómica de los participantes. La figura muestra el número de ciclos de tratamiento con temozolomida metronómica que recibieron los pacientes luego de recaer a la PS hasta antes de presentar la segunda recaída.

Es de anotar que luego de la primera recaída, el 100% de los pacientes recibieron con la TMZm, el antiangiogénico bevacizumab. Los ciclos oscilaron entre 3 y 26 (Figura 27).

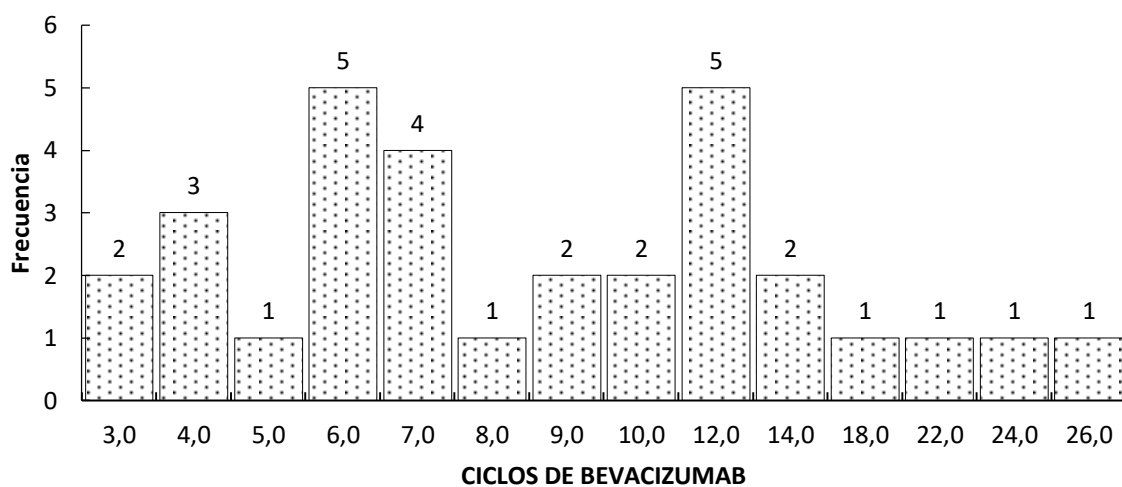


Figura 27. Ciclos de bevacizumab de los participantes. La figura muestra el número de ciclos de tratamiento con bevacizumab que recibieron los pacientes luego de recaer a la PS hasta antes de presentar la segunda recaída.

Dentro de las observaciones clínicas se encontró que el 20% de los pacientes se beneficiaron de moléculas blanco-dirigidas, sugeridas por el perfilamiento (Figura 28).

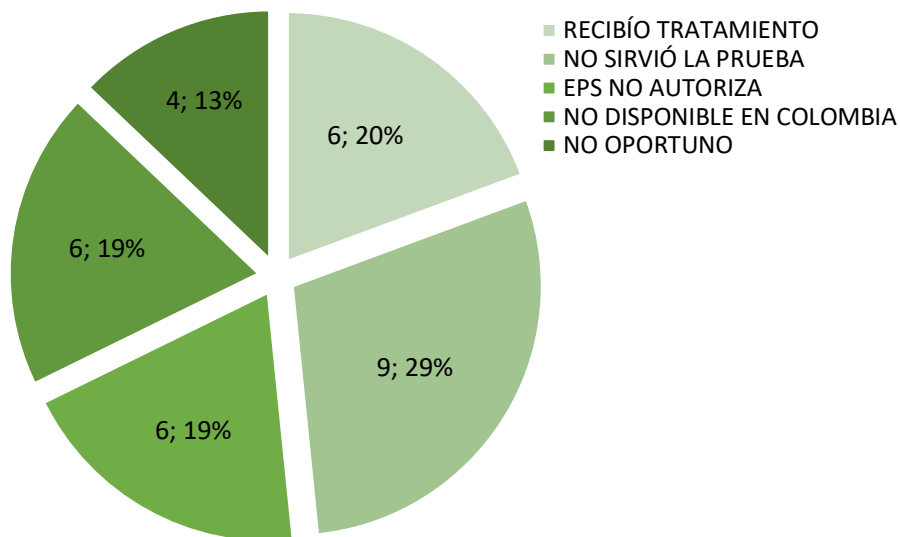


Figura 28. Observaciones clínicas realizadas en el proceso. La figura muestra tipos de tratamiento que recibieron los pacientes, basados en los resultados de F1-CDx, luego de la segunda recaída.

7.1.3 Descripción de los resultados de las pruebas genómicas.

En el perfilamiento de los datos obtenidos de los 31 pacientes con HGG, se efectuaron perfilamiento en bloque de parafina en 26 pacientes y biopsia líquida en 5 pacientes. Se encontraron encontrando que había 185 genes mutados y 322 mutaciones diferentes (130 drivers y 192 de significado incierto), lo que permitió reevaluar el diagnóstico histológico en 4 pacientes, el 17 y el 19 de cambian de GB a $A^{MUT-IDH/G3-4}$; el 26 que cambia de AA a $O^{MUT-IDH,1p/19q/G3}$ y el 30 de OAA que cambia a $A^{MUT-IDH/G3-4}$ (Tabla 8).

Tabla 8. Pacientes a quienes se les efectúa F1-CDx. La tabla muestra los pacientes su diagnóstico OMS 4^a-ed, tipo y muestra utilizada para F1-Dx, mutaciones ya reportadas previamente, mutaciones de significado incierto y cambio en el diagnóstico basado en OMS 5^a-ed.

OMS-4ed, 2016	OMS-5ed, 2021
---------------	---------------

Paciente Número	Diagnóstico inicial	Tipo de muestra (F-1CDX)	Mutaciones ya reportadas en cáncer como drivers	Mutaciones de significado incierto	Reclasificación del glioma difuso infiltrante del adulto
1	Glioblastoma	Bloque de parafina	<i>BCORL1 D90G - subclonal</i> <i>CDH1 Y190C - subclonal</i> <i>HGF R468H - subclonal</i> <i>TERT promotor - 124C>T</i>	<i>MAP3K13</i> <i>SPEN</i> <i>MED12</i> <i>TSC1</i> <i>RAD51D</i> <i>RICTOR</i>	GB ^{WT-IDH}
2	Glioblastoma	Bloque de parafina	<i>EGFR P596L, amplificación, EGFRvIII</i> <i>PIK3CA G118D</i> <i>CDKN2A/B</i> <i>Perdida</i> <i>NOTCH1</i> <i>P2415_Q2416ins</i> <i>PP</i> <i>TERT promotor - 124C>T</i> <i>TP53 Y220H</i>	<i>ALK</i> <i>MYD88</i> <i>TEK</i> <i>ALOX12B</i> <i>NOTCH1</i> <i>CD79A</i> <i>POLE</i> <i>MPL</i> <i>RET</i>	GB ^{WT-IDH}
3	Glioblastoma	Biopsia líquida	NO	<i>EP300</i> <i>NOTCH3</i> <i>ERBB3</i> <i>MSH2</i> <i>MSH3</i>	GB ^{WT-IDH}
4	Glioblastoma	Bloque de parafina	<i>KIT amplificación - equivocada</i> <i>PDGFRA N659K, amplificación</i> <i>KDR amplificación equivocada</i> <i>CDKN2A/B</i> <i>perdida</i> <i>TERT promotor - 124C>T</i>	<i>AR</i> <i>TSC1</i> <i>DIS3</i> <i>PPP2RIA</i> <i>SNCAIP</i>	GB ^{WT-IDH}
5	Glioblastoma	Bloque de parafina	<i>EGFR EGFRvIII, amplificación</i>	<i>ARAF</i> <i>RPTOR</i>	GB ^{WT-IDH}

OMS-4ed, 2016			OMS-5ed, 2021		
Paciente Número	Diagnóstico inicial	Tipo de muestra (F-1CDX)	Mutaciones ya reportadas en cáncer como drivers	Mutaciones de significado incierto	Reclasificación del glioma difuso infiltrante del adulto
			<p><i>PTEN</i> perdida</p> <p><i>CDKN2A/B</i>, <i>CDKN2A</i> perdida, <i>CDKN2B</i> perdida</p> <p><i>MTAP</i> perdida de exones 2-8</p> <p><i>TERT</i> promotor - 124C>T</p>	<p><i>ESR1</i></p> <p><i>LTK</i></p> <p><i>MUTYH</i></p>	
6	Glioblastoma	Bloque de parafina	<p><i>EGFR</i> G598V - subclonal, P596L - subclonal, A289V, amplificación, <i>EGFRvIII</i></p> <p><i>PTEN</i> R173C</p> <p><i>CDKN2A/B</i> perdida</p> <p><i>MTAP</i> perdida</p> <p><i>TERT</i> promotor - 124C>T</p>	<p><i>EGFR</i></p> <p><i>RPTOR</i></p> <p><i>ERBB2</i></p> <p><i>TEK</i></p> <p><i>FGFR1</i></p> <p><i>FLT1</i></p>	GB ^{WT-IDH}
7	Glioblastoma	Bloque de parafina	<p><i>EGFR</i> amplificación</p> <p><i>KIT</i> amplificación</p> <p><i>PDGFRA</i> amplificación</p> <p><i>CDK4</i> amplificación</p> <p><i>KEAP1</i> A27fs*10</p> <p><i>MDM2</i> amplificación</p> <p><i>PIK3R1</i> L449_E451del</p> <p><i>TERT</i> promotor -</p>	<p><i>CCN2</i></p> <p><i>PPARG</i></p> <p><i>MAF</i></p> <p><i>TET2</i></p> <p><i>NOTCH3</i></p> <p><i>PIK3C2G</i></p>	GB ^{WT-IDH}

OMS-4ed, 2016			OMS-5ed, 2021		
Paciente Número	Diagnóstico inicial	Tipo de muestra (F-1CDX)	Mutaciones ya reportadas en cáncer como drivers	Mutaciones de significado incierto	Reclasificación del glioma difuso infiltrante del adulto
			124C>T		
8	Glioblastoma	Bloque de parafina	<i>CDK4</i> amplificación <i>FGFR3 FGFR3-TACC3</i> fusión <i>MDM2</i> amplificación	<i>ERBB3</i> <i>RPTOR</i> <i>JAK2</i> <i>KMT2A(MLL)</i> <i>MDM2</i>	GB ^{WT-IDH}
9	Glioblastoma	Biopsia líquida	<i>TERT</i> promotor - 146C>T <i>ATM T2911fs*14</i> <i>DNMT3A</i> <i>K382fs*25</i>	<i>POLE</i> <i>RPTOR</i> <i>SPEN</i> <i>TSC1</i>	GB ^{WT-IDH}
10	Glioblastoma	Biopsia líquida	<i>FANCL S351fs*2</i> <i>NRAS G12D</i> <i>MSH6 I258T</i>	<i>GNAS</i> <i>VHL</i> <i>KIT</i> <i>MED12</i> <i>MLH1</i>	GB ^{WT-IDH}
11	Glioblastoma	Bloque de parafina	<i>NF1 N1563fs*11</i> , sitio de corte y empalme 3709- 1G>A <i>CDK6</i> amplificación <i>HGF</i> amplificación <i>CBL C384Y</i> - subclonal <i>PTPN11 E69K</i>	<i>ALK</i> <i>NF2</i> <i>GRM3</i> <i>PIK3RI</i> <i>IRF4</i> <i>TSC1</i> <i>MML2</i>	GB ^{WT-IDH}
12	Glioblastoma	Bloque de parafina	<i>PDGFRA D842V</i> <i>CCND2</i> amplificación equivoca <i>FGF23</i> amplificación equivoca	<i>BRIP1</i> <i>MAF</i> <i>SMAD2</i> - <i>BTK</i> <i>NOTCH2</i> <i>SPEN</i> <i>CDHH</i> - <i>RAD52</i> <i>TYR03</i>	GB ^{WT-IDH}

OMS-4ed, 2016			OMS-5ed, 2021		
Paciente Número	Diagnóstico inicial	Tipo de muestra (F-1CDX)	Mutaciones ya reportadas en cáncer como drivers	Mutaciones de significado incierto	Reclasificación del glioma difuso infiltrante del adulto
			<i>FGF6</i> amplificación equivocada	<i>KEAP1</i> <i>RET</i>	
			<i>KDM5A</i> amplificación		
			<i>NTRK1 D537E</i>		
			<i>TP53 R248W</i>		
13	Glioblastoma	Bloque de parafina	<i>NF1</i> sitio de corte y empalme 1642-2A>G <i>CDKN2A/B</i> <i>CDKN2A</i> perdida, <i>CDKN2B</i> perdida <i>CDKN2C G38*</i> <i>MTAP</i> Perdida <i>MUTYH G382D</i> <i>PTPN11 A72D</i> <i>SETD2 Q7*</i> <i>TERT</i> promotor - 146C>T <i>TP53</i> sitio de corte y empalme 622_672+36del87	<i>BTB2</i> <i>RAD54L</i> <i>CBL</i> <i>CIC</i> <i>FANCA</i>	GB ^{WT-IDH}
14	Glioblastoma	Bloque de parafina	<i>BRAF V600E</i> <i>CDKN2A/B</i> Perdida <i>TERT</i> promotor - 124C>T	<i>ERBB3</i> <i>ZNF703</i> <i>NOTCH1</i> <i>PDCD1LG(P</i> <i>D-L2)</i> <i>SGK1</i>	GB ^{WT-IDH}
15	Glioblastoma	Bloque de parafina	<i>MDM4</i> amplificación <i>PIK3C2B</i> amplificación <i>TERT</i> promotor -	<i>ABL</i> <i>PIK3C2B</i> re-arreglo <i>AXIN1</i> <i>PTEN</i> <i>EED</i> <i>MSH2</i>	GB ^{WT-IDH}

OMS-4ed, 2016			OMS-5ed, 2021		
Paciente Número	Diagnóstico inicial	Tipo de muestra (F-1CDX)	Mutaciones ya reportadas en cáncer como drivers	Mutaciones de significado incierto	Reclasificación del glioma difuso infiltrante del adulto
			146C>T		
16	Glioblastoma	Bloque de parafina	NF1 L1253fs*9 ATRX T1582fs*19 MLH1 F261fs*7 RB1 R763fs*31 TP53 R248W	ABL1 KEL SPEN CREBBP MEF2B EP300 NOTCH3 INPP4B PMS2	GB ^{WT-IDH}
17	Glioblastoma	Bloque de parafina	IDH1 R132H TP53 Y236C	ATRX MED12 CD22 ZNF703 EP300 KDR	A ^{MUT-IDH/G3-4}
18	Glioblastoma	Bloque de parafina	EGFR amplificación ARID1A R1637Q RB1 sitio de corte y empalme 1499-2A>C, E166* TERT promotor - 124C>T TP53 C238W - subclonal, A161S, T125M, R248Q†	AR MLH1 EGFR PRKCI EP300 RET ESR1 TP53	GB ^{WT-IDH}
19	Glioblastoma	Bloque de parafina	DH1 R132H ATRX E453fs*15 KEL R428C TP53 V157F	GATA4 TYR03	A ^{MUT-IDH/G3-4}
20	Glioblastoma	Bloque de parafina	STAT3 S614R - subclonal RB1 perdida STAG2 A532V - subclonal TERT promotor - 124C>T	BCOR U2AF1 FLT1 HSD3D, NOTCH2	GB ^{WT-IDH}

OMS-4ed, 2016			OMS-5ed, 2021		
Paciente Número	Diagnóstico inicial	Tipo de muestra (F-1CDX)	Mutaciones ya reportadas en cáncer como drivers	Mutaciones de significado incierto	Reclasificación del glioma difuso infiltrante del adulto
			TP53 C124*		
21	Glioblastoma	Bloque de parafina	BCOR I1511fs*23 MUTYH Y165C U2AF1 S34Y	AXL KDR SET2 BRD4 KEL SOX9 BTK MRE11A DNMT3A PTCH1	GB ^{WT-IDH}
22	Astrocitoma anaplásico	Bloque de parafina	CDKN2A/B perdida IDH2 R172K MTAP perdida NOTCH1 sitio de corte y empalme 1255+1G>A, sitio de corte y empalme 2207+2T>C subclonal TERT promotor - 124C>T	ATR DIS3 NTRK BRCA1 FANCC PIK3R1 BRCA2 GNAS PRDM1 BRIP1 NOTCH, SMARCA4	A ^{MUT-IDH/G3-4}
23	Astrocitoma anaplásico	Biopsia líquida	TP53 sitio de corte y empalme 375+1G>A	XIN1 TSC1 BRCA2 MAP2K2 (MEK2) MAP3K1	A ^{MUT-IDH/G3-4}
24	Astrocitoma anaplásico	Bloque de parafina	NF1 L484fs*14, K1714* CARD11 E756K - subclonal SETD2 S381*, R70*, W1562* STAG2 R1012* - subclonal TP53 G279E	ALK MLL2 ASXL1 NOTCH3 BTK PIK3C2B EPHB4	A ^{MUT-IDH/G3-4}
25	Astrocitoma	Bloque de	EP300 EP300-	NTRK1	A ^{MUT-IDH/G3-4}

OMS-4ed, 2016			OMS-5ed, 2021		
Paciente Número	Diagnóstico inicial	Tipo de muestra (F-1CDX)	Mutaciones ya reportadas en cáncer como drivers	Mutaciones de significado incierto	Reclasificación del glioma difuso infiltrante del adulto
	anaplásico	parafina	<i>BCOR fusion</i> <i>SETD2 Q7*</i>	<i>TET2</i> <i>RAD54L</i> <i>TSC1</i> <i>SPEN</i> <i>TBX3</i>	
26	Astrocitoma anaplásico	Bloque de parafina	<i>IDH1 R132H</i> <i>SOX2</i> <i>amplificación equivocada</i> <i>CIC W269*</i> <i>TERT promotor - 146C>T</i>	- <i>CXCR4</i> <i>TEK</i> <i>FGF19,</i> <i>TGFBR2</i> <i>IRS2</i> <i>SPEN</i>	○ MUT-IDH,1p/19q/G3
27	Oligoastrocitoma anaplásico	Bloque de parafina	<i>IDH1 R132H</i> <i>NF1 Y2162*</i> <i>TP53 V274G</i>	<i>CARD11</i> <i>NTRK2</i> <i>FGF6</i> <i>SMARCA4</i> <i>GABRA6</i> <i>MSH2</i>	○ MUT-IDH,1p/19q/G3
28	Oligoastrocitoma anaplásico	Biopsia líquida	<i>ABL1 P918L</i>	<i>ATR</i> <i>PPP2R1A</i> <i>BCL2</i> <i>SDHA</i> <i>NF1</i> <i>TSC1</i> <i>NOTCHH2</i> <i>ZNF703</i>	○ MUT-IDH,1p/19q/G3
29	Oligoastrocitoma anaplásico	Bloque de parafina	<i>IDH1 R132H</i> <i>ARID1A</i> <i>A2175fs*50</i> <i>CIC R1515C</i> <i>TERT promotor - 146C>T</i>	<i>ALK</i> <i>DIS3</i> <i>MLL2</i> <i>TSC2</i> <i>AXL</i> <i>FLCN</i> <i>POLE</i> <i>BRD4</i> <i>FLT3</i> <i>ROS1</i> <i>CREBBP</i> <i>LTK</i> <i>SPEN</i>	○ MUT-IDH,1p/19q/G3
30	Oligoastrocitoma anaplásico	Bloque de parafina	<i>IDH1 R132H</i> <i>CDH1 R335*</i> <i>TP53 R175H</i>	<i>ATRX</i> <i>KLHL6</i> <i>DIS3</i> <i>MLL2</i> <i>FANCL</i> <i>MSH3</i> <i>KDR</i> <i>POLD1.</i>	A ^{MUT-IDH/G3-4}
31	Oligodendroglioma	Bloque de parafina	<i>IDH1 R132H</i>	<i>BCOR</i> <i>MAP3K1</i>	○ MUT-IDH,1p/19q/G3

OMS-4ed, 2016		OMS-5ed, 2021			
Paciente Número	Diagnóstico inicial	Tipo de muestra (F-1CDX)	Mutaciones ya reportadas en cáncer como drivers	Mutaciones de significado incierto	Reclasificación del glioma difuso infiltrante del adulto
	anaplásico		<i>ARID1A</i> sitio de corte y empalme 2733-1G>A - subclonal, Q1415* - subclonal <i>CIC</i> E1454fs*2, sitio de corte y empalme 2699-1G>C <i>FUBP1</i> E411fs*11 <i>NOTCH1</i> sitio de corte y empalme 2588-4_2588-1GCAG>ACAA - subclonal, R448Q - subclonal <i>TERT</i> promotor - 124C>T <i>TP53</i> H179Q - subclonal	<i>TSC1</i> <i>CIC</i> <i>POLE</i> <i>FGFR1</i> <i>NFR43</i> <i>KIT</i> <i>ROS1</i> .	

El corte a la segunda recaída fue a los 22 meses (por plausibilidad), momento para el cual estaban vivos 8 de los 31 pacientes. La SLP a la primera recaída es el tiempo transcurrido de la cirugía inicial a la recaída luego del uso del PS. La SLP a la segunda recaída va de la cirugía inicial a la recaída luego del uso de temozolomida metronómica. La sobrevida global va desde la cirugía inicial a la muerte. (Tabla 9).

Tabla 9. Reclasificación patológica de los pacientes según OMS-5ed, 2021. Se puede observar el cambio del diagnóstico inicial (OMS-4ed, 2016), a la nueva clasificación según OMS-5ed, 2021 y los desenlaces o sea la SLP a la primera y segunda recaída y la OS.

Paciente Número	Diagnostico inicial	Reclasificación del glioma difuso infiltrante del adulto	SLP a la primera recaída (meses)	SLP a la segunda recaída (meses)	Sobrevida global (meses)
1	Glioblastoma	GB ^{WT-IDH}	13.6	17.6	19.4
2	Glioblastoma	GB ^{WT-IDH}	18.3	34.3	38
3	Glioblastoma	GB ^{WT-IDH}	10.1	13.1	17.1
4	Glioblastoma	GB ^{WT-IDH}	7.9	13.6	18
5	Glioblastoma	GB ^{WT-IDH}	23.4	37.2	42
6	Glioblastoma	GB ^{WT-IDH}	7.9	19.7	27.1
7	Glioblastoma	GB ^{WT-IDH}	14.8	47.2	54
8	Glioblastoma	GB ^{WT-IDH}	9.8	15.1	18.8
9	Glioblastoma	GB ^{WT-IDH}	11	19.1	24
10	Glioblastoma	GB ^{WT-IDH}	3	4.5	6.4
11	Glioblastoma	GB ^{WT-IDH}	10.3	14.2	vivo
12	Glioblastoma	GB ^{WT-IDH}	8	13.1	20
13	Glioblastoma	GB ^{WT-IDH}	14.1	21.2	vivo
14	Glioblastoma	GB ^{WT-IDH}	14.3	23.6	28.7
15	Glioblastoma	GB ^{WT-IDH}	2.2	2.5	9.7
16	Glioblastoma	GB ^{WT-IDH}	16.1	79.3	84.5
17	Glioblastoma	A ^{MUT-IDH/G3-4}	23.1	26.6	34
18	Glioblastoma	GB ^{WT-IDH}	6.6	10.1	15.4
19	Glioblastoma	A ^{MUT-IDH/G3-4}	18.4	28.8	vivo
20	Glioblastoma	GB ^{WT-IDH}	21.1	32.4	36.6
21	Glioblastoma	GB ^{WT-IDH}	12.5	26.2	31
22	Astrocitoma anaplásico	A ^{MUT-IDH/G3-4}	61.4	73	87.7
23	Astrocitoma anaplásico	A ^{MUT-IDH/G3-4}	6.8	11.7	vivo
24	Astrocitoma anaplásico	A ^{MUT-IDH/G3-4}	8.6	13	14,5
25	Astrocitoma anaplásico	A ^{MUT-IDH/G3-4}	10.1	13.3	19
26	Astrocitoma anaplásico	O ^{MUT-IDH,1p/19q/G3}	52.6	64.4	vivo
27	Oligoastrocitoma anaplásico	O ^{MUT-IDH,1p/19q/G3}	238.4	253.9	vivo
28	Oligoastrocitoma anaplásico	O ^{MUT-IDH,1p/19q/G3}	15.2	20.4	vivo
29	Oligoastrocitoma anaplásico	O ^{MUT-IDH,1p/19q/G3}	145.7	152.7	vivo
30	Oligoastrocitoma anaplásico	A ^{MUT-IDH/G3-4}	10.1	13.3	45
31	Oligodendroglioma anaplásico	O ^{MUT-IDH,1p/19q/G3}	13.6	24.9	32.1

Se resaltan en rojo los pacientes en los que cambio el diagnostico patológico.
Sobrevida libre de progresión (SLP) y la sobrevida global (OS).

Se relaciona el consolidado final que incluye edad, sexo, diagnóstico inicial, mutación de IDH por IHQ, FISH para codeleción 1p/19q, estado de metilación de promotor para MGMT. Tipo de muestra enviada para el perfilamiento genómico, mutaciones conocidas como *drivers* en cáncer, mutaciones de significado desconocido y desenlaces o sea SLP a la primera y segunda recaída y sobrevida global (Tabla 10).

Tabla 10. Consolidado final de diagnóstico inicial y final con desenlaces. Se resaltan los pacientes que cambian: de glioblastoma (OMS-4^{ed}) a A^{MUT-IDH/G3-4} (pacientes 17 y 19), con astrocitoma anaplásico (OMS-4^{ed}) que cambian a O^{MUT-IDH, 1p/19q/G3} (paciente 26) y con oligoastrocitoma anaplásico (OMS-4^{ed}) que cambia a A^{MUT-IDH, grado3-4} (paciente 30).

Diagnóstico inicial	Diagnóstico histológico inicial	Codificación 1p/19q	Mutación IDH	Metilación del promotor MGMT	F1-CDX	Mutaciones conocidas en cancer	Mutaciones de significado inalterado	Reclasificación patológica	Desenlaces SLP a la primera recaída (meses)	SLP a la segunda recaída (meses)	Sobrevida global (meses)			
1	38 años Femenino	Glioblastoma	No busca	se No busca	Silvestre	No metilado	Bloque de parafina	de	BCORL1 subclonal D90G -	MAP3K13 SPEN MED12 TSC1	GB ^{WT-IDH}	13.6	17.6	19.4
2	67 años Masculino	Glioblastoma	No busca	se No busca	Silvestre	No metilado	Bloque de parafina	de	CDH1 subclonal Y190C - HGF subclonal R468H - TERT promotor 124C>T	ALK MYD88 TEK ALOX12B NOTCH1 CD79A POLE MPL RET	GB ^{WT-IDH}	18.3	34.3	38
3	59 años Masculino	Glioblastoma	No busca	se No busca	Silvestre	No metilado	Biopsia líquida	de	TP53 Y220H	EP300 NOTCH3 ERBB3 MSH2 MSH3	GB ^{WT-IDH}	10.1	13.1	17.1
4	62 años Femenino	Glioblastoma	No busca	se No busca	Silvestre	No metilado	Bloque de parafina	de	KIT amplificación equivoca	AR TSC1 D1S3 PPP2R1A SNCAIP	GB ^{WT-IDH}	7.9	13.6	18
CDKN2A/B perdida														

Diagnóstico inicial	Paciente	Edad	Sexo	Diagnostico histológico inicial	Codetección 1p/19q	Mutación IDH	Mutación se busca	Metilación del promotor MGMT	F1-CDx	Tipo de muestra	Mutaciones conocidas en cancer	Mutaciones de significado incierto	Reclasificación patológica	Desenlaces SLP a la primera recaída (meses)	SLP a la segunda recaída (meses)	Sobrevivida global (meses)
											TERT promotor - 124C>T					
											EGFR amplificación EGFRVIII, PTEN perdida					
5	46 años	Femenino		Glioblastoma	No busca	No busca	No busca	No busca	Bloque de parafina		CDKN2A/B, CDKN2A perdida, CDKN2B perdida MTAP perdida de exones 2-8 TERT promotor - 124C>T	ARAF RPTOR ESR1 LTK MUTYH	GB ^{WT-IDH}	23.4	37.2	42
6	55 años	Masculino		Glioblastoma	No busca	Se Silvestre	No busca	No busca	Bloque de parafina		EGFR G598V - subclonal, P596L - subclonal, A289V, amplificación, EGFRVIII PTEN R173C CDKN2A/B perdida MTAP perdida TERT promotor - 124C>T	EGFR RPTOR ERBB2 TEK FGFR1 FLTI	GB ^{WT-IDH}	7.9	19.7	27.1
											EGFR amplificación KIT amplificación					
											PDGFRA amplificación CDK4 amplificación KEAP1 A277S*10 MDM2 amplificación PIK3R1 L449_E451del	CCN2 PPARG MAF TET2 NOTCH3 PIK3C2G				
7	69 años	Femenino		Glioblastoma	No busca	Se Silvestre	No busca	No metilado	Bloque de parafina				GB ^{WT-IDH}	14.8	47.2	54

Diagnóstico Inicial	Paciente	Diagnóstico histológico Inicial	Codelección 1p/19q	Mutación IDH	Mutación del promotor MGMT	F1-CDx Tipo de muestra	Mutaciones conocidas en cancer	Mutaciones de significado inclaro	Reclasificación patológica	Desenlaces SLP a la primera recaída (meses)	SLP a la segunda recaída (meses)	Supervivencia global (meses)
CDK4 amplificación												
8	22 años Femenino	Glioblastoma	No busca	No busca	No busca	Bloque de parafina	FGFR3 TACC3 fusión MDM2 amplificación TERT promotor -	ERBB3 RPTOR JAK2 KMT2A(MLL) MDM2	GB ^{WT-IDH}	9.8	15.1	18.8
CDK4 amplificación												
9	44 años Femenino	Glioblastoma	No busca	No busca	No metilado	Biopsia líquida	ATM T2911fs*14 DNMT3A K382fs*25 FANCL S351fs*2	POLE RPTOR SPEN TSC1 GNAS	GB ^{WT-IDH}	11	19.1	24
10	41 años Femenino	Glioblastoma	No busca	silvestre	No busca	Biopsia líquida	NRAS G12D MSH6 1258T NF1 N1563fs*11, sitio de corte y empalme 3709-1G>A	VHL KIT MED12 MLH1	GB ^{WT-IDH}	3	4.5	6.4
CDK6 amplificación												
11	69 años Masculino	Glioblastoma	No busca	No busca	No metilado	Bloque de parafina	HGF amplificación CBL C384Y subclonal PTPN11 E69K TERT promotor -	ALK NF2 GRM3 PIK3RI IRF4 TSC1 MML2	GB ^{WT-IDH}	10.3	14.2	VIVO
PDGFRA D842V												
BRIP1												
MAF												
SMAD2												
CCND2 amplificación -equivoca												
BTK												
NOTCH2												
SPEN												
CDHH												
RAD52												
TYR03												
KEAP1												
RET												
12	22 años Masculino	Glioblastoma	No busca	No busca	No busca	Bloque de parafina	FGF23 amplificación -equivoca FGF6 amplificación -equivoca	GB ^{WT-IDH}	8	13.1	20	

Diagnóstico inicial Paciente Edad Sexo	Diagnostico histológico inicial	Codetección 1p/19q	Mutación IDH	Metilación del promotor MGMT	F1-CDx Tipo de muestra	Mutaciones conocidas en cancer	Mutaciones de significado incierto	Reclasificación patológica	Desenlaces SLP a la primera recada (meses)	SLP a la segunda recada (meses)	Sobrevida global (meses)				
KDM5A amplificación															
NTRK1 D537E															
TP53 R248W															
NF1 sitio de corte y empalme 1642-2A>G															
CDKN2A/B CDKN2A perdida, CDKN2B perdida															
CDKN2C G38*															
MTAP perdida															
13	68 años Masculino	Glioblastoma	No busca	se	No busca	Silvestre	Metilado	Bloque de parafina	MUTYH G382D PTPN11 A72D SETD2 Q7*	BTB2 RAD54L CBL CIC FANCA	GB ^{WT-IDH}	14.1	21.2	vivo	
TERT promotor - 146C>T TP53 sitio de corte y empalme 622_672+36del87															
BRAF V600E															
ERBB3 ZNF703 NOTCH1 PDDCD1LG(PD- L2) SGK1															
14	42 años Masculino	Glioblastoma	No busca	se	No busca	No busca	No busca	Bloque de parafina	CDKN2A/B perdida TERT promotor - 124C>T	MDM4 amplificación	ABL PIK3C2B rearrangement	GB ^{WT-IDH}	14.3	23.6	28.7
MDM4 amplificación															
PIK3C2B amplificación															
TERT promotor - 146C>T															
MSH2															
NF1 L1253fs*9															
ABL1 KEL															
ATRX T1582fs*19															
SPEN															
CREBBP															
MEF2B															
EP300															
NOTCH3															
RB1 R763fs*31															
16	44 años Masculino	Glioblastoma	No busca	se	No busca	Silvestre	Metilado	Bloque de parafina	ATRX T1582fs*19 MLH1 F261fs*7 RB1 R763fs*31	ABL1 KEL SPEN CREBBP MEF2B EP300 NOTCH3	GB ^{WT-IDH}	16.1	79.3	84.5	

Diagnóstico Inicial	Paciente Edad Sexo	Diagnóstico histológico Inicial	Codelección 1p/19q	Mutación IDH	Metilación del promotor MGMT	F1-CDX Tipo de muestra	Mutaciones conocidas en cancer	Mutaciones de significado inclaro	Reclasificación patológica	Desenlaces SLP a la primera recaída (meses)	SLP a la segunda recaída (meses)	Sobrevivida global (meses)
17	49 años Femenino	Glioblastoma	No busca	se mutado	Metilado	Bloque de parafina	IDH1 R132H TP53 Y236C	ATRX MED12 CD22 ZNF703 EP300 KDR	A ^{MUT-IDHG3-4}	23.1	26.6	34
18	63 años Femenino	Glioblastoma	No busca	se Silvestre	No metilado	Bloque de parafina	-EGFR amplificación -ARID1A R1637Q -RB1 sitio de corte y empalme 1499-2A>C; E166* -TERT promotor 124C>T -TP53 C238W subclonal, A161S, T125M, R248Q† DH1 R132H	AR MLH1 EGFR PRKCI EP300 RET ESR1 TP53	GB ^{WT-IDH}	6.6	10.1	15.4
19	49 años Masculino	Glioblastoma	No busca	se No busca	No busca	Bloque de parafina	ATRX E453S*15 KEL R428C TP53 V157F	GATA4 TYR03	A ^{MUT-IDHG3-4}	18.4	28.8	Vivo
20	67 años Masculino	Glioblastoma	No busca	se No busca	No busca	Bloque de parafina	-STAT3 S614R subclonal -RB1 loss -STAG2 A532V subclonal -TERT promotor 124C>T -TP53 C124*	BCOR U2AF1 FLT1 HSD3D, NOTCH2	GB ^{WT-IDH}	21.1	32.4	36.6
21	66 años Femenino	Glioblastoma	No busca	se No busca	No busca	Bloque de parafina	BCOR 11511fs*23 MUTYH Y165C U2AF1 S34Y	AXL KDR SET2 BRD4 KEL SOX9 BTk MRE11A DNMT3A PTCH1	GB ^{WT-IDH}	12.5	26.2	31
22	45 años Femenino	Astrocitoma Anaplasico	No busca	se mutado	Metilado	Bloque de parafina	CDKN2A/B perdida IDH2 R172K	ATR DIS3 NTRK	A ^{MUT-IDHG3-4}	61.4	73	87.7

Diagnóstico inicial	Paciente	Diagnóstico histológico inicial	Codelección	Mutación	Metilación del promotor MGMT	F1-CDx	Mutaciones conocidas en cáncer	Mutaciones de significado incierto	Reclasificación patológica	Desenlaces SLP a la primera recaída (meses)	SLP a la segunda recaída (meses)	Sobrevivida global (meses)
							<p>MTAP perdida</p> <p>BRCA1</p> <p>FANCC</p> <p>PIK3R1</p> <p>BRCA2</p> <p>GNAS</p> <p>PRDM1</p> <p>BRIP1</p> <p>2207+2T>C</p> <p>subclonal</p> <p>SMARCA4</p>					
							<p>TERT promotor</p> <p>124C>T</p>					
							<p>TP53 sitio de corte y empalme 3'5+1G>A</p> <p>NF1</p> <p>K1714*</p> <p>L484fs*14,</p> <p>CARD11</p> <p>subclonal</p> <p>EP300</p> <p>W1562*</p> <p>STAG2</p> <p>R1012*</p> <p>subclonal</p> <p>TP53 G279E</p>	<p>XIN1</p> <p>TSC1</p> <p>BRCA2</p> <p>MAP2K2 (MEK2)</p> <p>MAP3K1</p> <p>ALK</p> <p>MLL2</p> <p>ASXL1</p> <p>NOTCH3</p> <p>BTK</p> <p>PIK3C2B</p> <p>EPHB4</p>	<p>A^{MUT-IDH1G3-4}</p>	6.8	11.7	VIVO
23	46 años	Astrocioma Anaplásico	No busca	se mutado	No busca	Biopsia líquida						
24	46 años	Astrocioma Anaplásico	No busca	se mutado	Metilado	Bloque de parafina						
25	25 años	Astrocioma Anaplásico	No busca	se mutado	No metilado	Bloque de parafina	<p>EP300</p> <p>EP300-BCOR</p> <p>fusión</p> <p>SETD2 Q7*</p> <p>TP53 G279E</p>	<p>NTRK1</p> <p>TET2</p> <p>RAD54L</p> <p>TSC1</p> <p>SPEN</p> <p>TBX3</p>	<p>A^{MUT-IDH1G3-4}</p>	10.1	13.3	19
26	51 años	Astrocioma Anaplásico	1p/19q+	mutado	No busca	Bloque de parafina	<p>IDH1 R132H</p> <p>SOX2 amplificación</p> <p>equivoca</p> <p>C1C W269*</p> <p>TERT promotor</p> <p>146C>T</p>	<p>CXCR4</p> <p>TEK</p> <p>FGF19</p> <p>TGFBR2</p> <p>IRS2</p> <p>SPEN</p>	<p>Q^{MUT-IDH1p19qG3}</p>	52.6	64.4	VIVO
27	35 años	Oligoastrocioma Anaplásico	1p/19q+	mutado	Metilado	Bloque de parafina	<p>IDH1 R132H</p> <p>NF1 Y2162*</p> <p>TP53 V274G</p>	<p>CARD11</p> <p>NTRK2</p> <p>FGF6</p> <p>SMARCA4</p> <p>GABRA6</p>	<p>Q^{MUT-IDH1p19qG3}</p>	238.4	253.9	VIVO

Diagnóstico inicial	Paciente	Diagnóstico histológico inicial	Codelección 1p/19q	Mutación IDH	Metilación del promotor MGMT	F1-CDx Tipo de muestra	Mutaciones conocidas en cáncer	Mutaciones de significado incierto	Reclasificación patológica	Desenlaces SLP a la primera recaída (meses)	SLP a la segunda recaída (meses)	Supervivencia global (meses)
28 años	Masculino	Oligoastrocitoma Anaplásico	No busca	mutado	No busca	Biopsia líquida	ABL1 P918L	MSH2 ATR PPP2R1A BCL2 SDHA NF1 TSC1 NOTCHH2 ZNF703	Q ^{MUT-IDH,1p/19q,G3}	15.2	20.4	vivo
29 años	Femenino	Oligoastrocitoma Anaplásico	1p/19q+	mutado	Metilado	Bloque de parafina	IDH1 R132H ARID1A A2175fs*50 CIC R1515C TERT promotor 146C>T	ALK DIS3 MLL2 TSC2 AXL FLCN POLE BRD4 FLT3 ROS1 CREBBP LTK SPEN	Q ^{MUT-IDH,1p/19q,G3}	145.7	152.7	vivo
30 años	Masculino	Oligoastrocitoma Anaplásico	No busca	silvestre	Metilado	Bloque de parafina	IDH1 R132H CDH1 R335* TP53 R175H	ATRX KLHL6 DIS3 MLL2 FANCL MSH3 KDR POLD1	A ^{MUT-IDH,G3,4}	10.1	13.3	45
31 años	Femenino	Oligodendroglioma Anaplásico	1p/19q	mutado	Metilado	Bloque de parafina	IDH1 R132H ARID1A sitio de corte y empalme 2733-1G>A - subclonal, Q1415* - subclonal, CIC E1454fs*2, sitio de corte y empalme 2699-1G>C FUBP1 E411fs*11 NOTCH1 sitio de corte y empalme 2588-4_2588-1GCAG>ACAA subclonal, R448Q - subclonal TERT promotor 124C>T TP53 H179Q - subclonal	BCOR MAP3K1 TSC1 CIC POLE FGFR1 NFR43 KIT ROS1	Q ^{MUT-IDH,1p/19q,G3}	13.6	24.9	32.1

Los genes que más se encontraron y que están relacionados con HGG (previamente reportados en HGG), en orden de frecuencia, fueron *IDH1* en un 61,3%, *TERT* en un 54,8%, *EGFR* en un 45,2%, *TP53* en un 41,9%, *CDKN2AB* en un 19,4%, *CIC* en un 16,1%, *ATRX* en un 12,9%, *NOTCH3* en un 12,9%, seguidos de *NOTCH1*, *NOTCH2*, *FUBP1* y *ATR* (Tabla 11).

Tabla 11. Genes que se encontraron en los pacientes ya antes reportados. Tabla en la que se relacionan genes encontrados en los 31 pacientes, ya antes reportados en gliomas.

Genes	No		Si	
	n	%	n	%
ATR	30	96,8%	1	3,2%
ATRX	27	87,1%	4	12,9%
CDKN2AB	25	80,6%	6	19,4%
CIC	26	83,9%	5	16,1%
EGFR	17	54,8%	14	45,2%
FUBP1	30	96,8%	1	3,2%
IDH1	12	38,7%	19	61,3%
NOTCH1	28	90,3%	3	9,7%
NOTCH2	28	90,3%	3	9,7%
NOTCH3	27	87,1%	4	12,9%
TERT	14	45,2%	17	54,8%
TP53	18	58,1%	13	41,9%

Hubo genes que están relacionados con HGG (previamente reportados en HGG), y no se encontraron en los pacientes (Tabla 12).

Tabla 12. Genes reportados que no se encontraron. Se relacionan genes previamente reportados en gliomas, pero que no se encontraron en la cohorte analizada.

Genes	Genes	Genes	Genes	Genes	Genes
AKT1	C11ORF30EMSY	EPHA3	FGFR4	MAP2K1MEK1	QKI
AKT2	CASP8	EPHB1	GSK3B	MET	RAC1
APC	CD274PDL1	FAM123B	ID3	PARP2	RAD21
AURKB	CSF1R	FANCC	IKZF1	PAX5	RBM10
BAP1	DDR1	FANCG	JAK3	PBRM1	REL
BRCA1	DOT1L	FBXW7	KRAS	PTPRO	SDHB
SMAD4	STK11	SYK	WHSC1MMSET		

Los genes mutados que se encontraron en los pacientes, pero incluyendo solo los que están relacionados con HGG (147 genes). En orden de frecuencia, estarían *IDH* en el 61% de los 31 pacientes, *TERT* en el 54,8%, *EGFR* en el 45,2%, *PDGFRA* en el 45%, *TP53* en el 41,9%, *SPEN* en el 25,8%, entre otros. De los genes necesarios a evaluar para subclasificar el tipo de glioma de alto grado, según la OMS 2021, también estarían *ATRX* en el 12,9%, *TP53* en el 41,9%, *CDKN2AB* en el 19,4%, *CIC* en el 16,1%, *FUBP1* con el 3,2% y *NOTCH 1* en el 9,7% de los pacientes (Tabla13).

Tabla 13. Genes mutados detectados, de los ya reportados. En la tabla se relacionan los genes ya identificados como conductores o drivers, de los 324 genes analizados en F1-CDx, por tipo de tumor.

Genes	No		Si		Genes	No		Si	
	n	%	n	%		n	%	n	%
IDH1	12	38,7%	19	61,3%	AXL	28	90,3%	3	9,7%
TERT	14	45,2%	17	54,8%	BCOR	28	90,3%	3	9,7%
EGFR	17	54,8%	14	45,2%	BRD4	28	90,3%	3	9,7%
PDGFRA	17	54,8%	14	45,2%	BTK	28	90,3%	3	9,7%
TP53	18	58,1%	13	41,9%	CDH1	28	90,3%	3	9,7%
SPEN	23	74,2%	8	25,8%	CREBBP	28	90,3%	3	9,7%
TSC1	23	74,2%	8	25,8%	ERBB3	28	90,3%	3	9,7%
CDKN2A B	25	80,6%	6	19,4%	KEL	28	90,3%	3	9,7%
NF1	25	80,6%	6	19,4%	LTK	28	90,3%	3	9,7%
ALK	26	83,9%	5	16,1%	MED12	28	90,3%	3	9,7%
CIC	26	83,9%	5	16,1%	MLH1	28	90,3%	3	9,7%
EP300	26	83,9%	5	16,1%	MSH2	28	90,3%	3	9,7%
MLL2	26	83,9%	5	16,1%	MTAP	28	90,3%	3	9,7%
POLE	26	83,9%	5	16,1%	MUTYH	28	90,3%	3	9,7%
ARID1A	27	87,1%	4	12,9%	NOTCH1	28	90,3%	3	9,7%
ATRX	27	87,1%	4	12,9%	NOTCH2	28	90,3%	3	9,7%
DIS3	27	87,1%	4	12,9%	PTEN	28	90,3%	3	9,7%
KDR	27	87,1%	4	12,9%	RB1	28	90,3%	3	9,7%
KIT	27	87,1%	4	12,9%	RET	28	90,3%	3	9,7%
NOTCH3	27	87,1%	4	12,9%	ROS1	28	90,3%	3	9,7%
RPTOR	27	87,1%	4	12,9%	TEK	28	90,3%	3	9,7%
SETD2	27	87,1%	4	12,9%	ZNF703	28	90,3%	3	9,7%
ABL1	28	90,3%	3	9,7%	AR	29	93,5%	2	6,5%

Genes	No		Si	
	n	%	n	%
AXIN1	29	93,5%	2	6,5%
CARD11	29	93,5%	2	6,5%
CBL	29	93,5%	2	6,5%
CCND2	29	93,5%	2	6,5%
CDK4	29	93,5%	2	6,5%
DNMT3A	29	93,5%	2	6,5%
ESR1	29	93,5%	2	6,5%
FANCL	29	93,5%	2	6,5%
FGF6	29	93,5%	2	6,5%
FGFR1	29	93,5%	2	6,5%
FLCN	29	93,5%	2	6,5%
FLT1	29	93,5%	2	6,5%
FLT3	29	93,5%	2	6,5%
HGF	29	93,5%	2	6,5%
KEAP1	29	93,5%	2	6,5%
MAF	29	93,5%	2	6,5%
MAP3K1	29	93,5%	2	6,5%
MDM2	29	93,5%	2	6,5%
MSH3	29	93,5%	2	6,5%
NTRK1	29	93,5%	2	6,5%
PIK3C2B	29	93,5%	2	6,5%
PIK3R1	29	93,5%	2	6,5%
PPP2R1A	29	93,5%	2	6,5%
PTPN11	29	93,5%	2	6,5%
RAD54L	29	93,5%	2	6,5%
STAG2	29	93,5%	2	6,5%
TET2	29	93,5%	2	6,5%
TSC2	29	93,5%	2	6,5%
TYRO3	29	93,5%	2	6,5%
U2AF1	29	93,5%	2	6,5%
ALOX12B	30	96,8%	1	3,2%
ARAF	30	96,8%	1	3,2%
ASXL1	30	96,8%	1	3,2%
ATM	30	96,8%	1	3,2%
ATR	30	96,8%	1	3,2%
BCL2	30	96,8%	1	3,2%
BCORL1	30	96,8%	1	3,2%
BRAF	30	96,8%	1	3,2%
BRCA2	30	96,8%	1	3,2%
BRIP1	30	96,8%	1	3,2%

Genes	No		Si	
	n	%	n	%
BTG2	30	96,8%	1	3,2%
CD22	30	96,8%	1	3,2%
CD79A	30	96,8%	1	3,2%
CDK6	30	96,8%	1	3,2%
CDKN2C	30	96,8%	1	3,2%
CXCR4	30	96,8%	1	3,2%
EED	30	96,8%	1	3,2%
EPHB4	30	96,8%	1	3,2%
ERBB2	30	96,8%	1	3,2%
FANCA	30	96,8%	1	3,2%
FGF19	30	96,8%	1	3,2%
FGF23	30	96,8%	1	3,2%
FGFR3	30	96,8%	1	3,2%
FUBP1	30	96,8%	1	3,2%
GABRA6	30	96,8%	1	3,2%
GATA4	30	96,8%	1	3,2%
GNAS	30	96,8%	1	3,2%
GRM3	30	96,8%	1	3,2%
HSD3B1	30	96,8%	1	3,2%
INPP4B	30	96,8%	1	3,2%
IRF4	30	96,8%	1	3,2%
IRS2	30	96,8%	1	3,2%
JAK2	30	96,8%	1	3,2%
KDM5A	30	96,8%	1	3,2%
KLHL6	30	96,8%	1	3,2%
KMT2AM	30	96,8%	1	3,2%
LL	30	96,8%	1	3,2%
MAP2K2	30	96,8%	1	3,2%
MEK2	30	96,8%	1	3,2%
MAP3K13	30	96,8%	1	3,2%
MDM4	30	96,8%	1	3,2%
MEF2B	30	96,8%	1	3,2%
MPL	30	96,8%	1	3,2%
MRE11A	30	96,8%	1	3,2%
MSH6	30	96,8%	1	3,2%
MYD88	30	96,8%	1	3,2%
NF2	30	96,8%	1	3,2%
NRAS	30	96,8%	1	3,2%
NTRK2	30	96,8%	1	3,2%
PDCD1L	30	96,8%	1	3,2%
G2PDL2	30	96,8%	1	3,2%

Genes	No		Si	
	n	%	n	%
PIK3C2G	30	96,8%	1	3,2%
PIK3CA	30	96,8%	1	3,2%
PMS2	30	96,8%	1	3,2%
POLD1	30	96,8%	1	3,2%
PPARG	30	96,8%	1	3,2%
PRKCI	30	96,8%	1	3,2%
PTCH1	30	96,8%	1	3,2%
RAD51D	30	96,8%	1	3,2%
RAD52	30	96,8%	1	3,2%
RICTOR	30	96,8%	1	3,2%
RNF43	30	96,8%	1	3,2%
SDHA	30	96,8%	1	3,2%

Genes	No		Si	
	n	%	n	%
SGK1	30	96,8%	1	3,2%
SMAD2	30	96,8%	1	3,2%
SMARCA4	30	96,8%	1	3,2%
SNCAIP	30	96,8%	1	3,2%
SOX2	30	96,8%	1	3,2%
SOX9	30	96,8%	1	3,2%
STAT3	30	96,8%	1	3,2%
TBX3	30	96,8%	1	3,2%
TGFBR2	30	96,8%	1	3,2%
VHL	30	96,8%	1	3,2%

En los 174 genes alterados, se detectaron 322 mutaciones en todos los HGG (130 mutaciones ya identificadas como drivers o conductoras en Cáncer y 192 de significado incierto). De estas 258 eran de glioblastoma, 56 de astrocitoma anaplásico, y en el grupo de los tumores de origen oligodendroglial 56, discriminadas así: 40 en los oligoastrocitomas anaplásicos y 16 en el oligodendroglioma anaplásico. En la tabla 11 se relacionan los genes mutados discriminados por tipo de tumor, incluyendo solo los genes que están relacionados con glioma de alto grado (n=185).

En los genes mutados en HGG, e importantes para reclasificarlos según OMS-5^{ed}: Para en GB para GB^{WT-IDH}: *TERT* 62% y *EGFR* 62%. En AA para A^{MUT-IDH/G3-4}: *ATRX* 40%, *TP56* 40%, *CDKN2AB* 0%. En tumores de estirpe oligodendroglial para O^{MUT-IDH,1p/19q/G3}: *CIC* 25%, *FUBP1* 0% y *NOTC1* 0% y en OA: *CIC* 100%, *FUBP1* 100% y *NOTCH1* 100% (Tabla 14).

Tabla 14. Genes ya reportados y detectados por tipo de tumor.

Genes	GB				AA				OAA				OA			
	No		Si		No		Si		No		Si		No		Si	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
ALK	17	81	4	19	5	100	0	0	3	75	1	25	1	100	0	0
ARID1A	19	90	2	10	5	100	0	0	3	75	1	25	0	0	1	100
BCOR	19	90	2	10	5	100	0	0	4	100	0	0	0	0	1	100
CCND2	21	100	0	0	3	60	2	40	4	100	0	0	1	100	0	0
CDKN2AB	15	71	6	29	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
CIC	19	90	2	10	4	80	1	20	3	75	1	25	0	0	1	100
EGFR	8	38	13	62	4	80	1	20	4	100	0	0	1	100	0	0
EP300	17	81	4	19	5	100	0	0	3	75	1	25	1	100	0	0
FGFR1	20	95	1	5	5	100	0	0	4	100	0	0	0	0	1	100
FUBP1	21	100	0	0	5	100	0	0	4	100	0	0	0	0	1	100
IDH1	6	29	15	71	3	60	2	40	3	75	1	25	0	0	1	100
KDR	17	81	4	19	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
KEAP1	21	100	0	0	3	60	2	40	4	100	0	0	1	100	0	0
KIT	20	95	1	5	3	60	2	40	4	100	0	0	0	0	1	100
MAF	21	100	0	0	3	60	2	40	4	100	0	0	1	100	0	0
MAP3K1	21	100	0	0	5	100	0	0	3	75	1	25	0	0	1	100
MLL2	17	81	4	19	5	100	0	0	3	75	1	25	1	100	0	0
NF1	16	76	5	24	5	100	0	0	3	75	1	25	1	100	0	0
NOTCH1	19	90	2	10	5	100	0	0	4	100	0	0	0	0	1	100
PDGFRA	9	43	12	57	3	60	2	40	4	100	0	0	1	100	0	0
POLE	18	86	3	14	5	100	0	0	3	75	1	25	0	0	1	100
RNF43	21	100	0	0	5	100	0	0	4	100	0	0	0	0	1	100
ROS1	20	95	1	5	5	100	0	0	3	75	1	25	0	0	1	100
RPTOR	17	81	4	19	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
SPEN	17	81	4	19	3	60	2	40	2	50	2	50	1	100	0	0
TERT	8	38	13	62	3	60	2	40	3	75	1	25	0	0	1	100
TP53	12	57	9	43	3	60	2	40	3	75	1	25	0	0	1	100
TSC1	17	81	4	19	5	100	0	0	1	25	3	75	0	0	1	100
TYRO3	21	100	0	0	3	60	2	40	4	100	0	0	1	100	0	0
ABL1	19	90	2	10	5	100	0	0	3	75	1	25	1	100	0	0
AKT1	21	100	0	0	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
AKT2	21	100	0	0	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
ALOX12B	20	95	1	5	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
APC	21	100	0	0	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
AR	19	90	2	10	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
ARAF	20	95	1	5	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
ASXL1	20	95	1	5	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
ATM	20	95	1	5	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
ATR	21	100	0	0	5	100	0	0	3	75	1	25	1	100	0	0
ATRX	18	86	3	14	4	80	1	20	4	100	0	0	1	100	0	0
AURKB	21	100	0	0	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
AXIN1	20	95	1	5	5	100	0	0	3	75	1	25	1	100	0	0
AXL	19	90	2	10	5	100	0	0	3	75	1	25	1	100	0	0
BAP1	21	100	0	0	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
BCL2	21	100	0	0	5	100	0	0	3	75	1	25	1	100	0	0
BCORL1	20	95	1	5	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
BRAF	20	95	1	5	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
BRCA1	21	100	0	0	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
BRCA2	21	100	0	0	5	100	0	0	3	75	1	25	1	100	0	0
BRD4	19	90	2	10	5	100	0	0	3	75	1	25	1	100	0	0
BRIP1	21	100	0	0	4	80	1	20	4	100	0	0	1	100	0	0
BTG2	20	95	1	5	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
BTK	19	90	2	10	4	80	1	20	4	100	0	0	1	100	0	0
C11ORF30EMSY	21	100	0	0	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
CARD11	19	90	2	10	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
CASP8	21	100	0	0	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
CBL	19	90	2	10	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
CD22	20	95	1	5	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0

Genes	GB				AA				OAA				OA			
	No		Si		No		Si		No		Si		No		Si	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
CD274PDL1	21	100	0	0	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
CD79A	20	95	1	5	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
CDH1	19	90	2	10	4	80	1	20	4	100	0	0	1	100	0	0
CDK4	20	95	1	5	4	80	1	20	4	100	0	0	1	100	0	0
CDK6	20	95	1	5	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
CDKN2C	20	95	1	5	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
CREBBP	19	90	2	10	5	100	0	0	3	75	1	25	1	100	0	0
CSF1R	21	100	0	0	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
CXCR4	21	100	0	0	4	80	1	20	4	100	0	0	1	100	0	0
DDR1	21	100	0	0	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
DIS3	18	86	3	14	5	100	0	0	3	75	1	25	1	100	0	0
DNMT3A	19	90	2	10	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
DOT1L	21	100	0	0	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
EED	20	95	1	5	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
EPHA3	21	100	0	0	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
EPHB1	21	100	0	0	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
EPHB4	20	95	1	5	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
ERBB2	20	95	1	5	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
ERBB3	18	86	3	14	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
ESR1	19	90	2	10	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
FAM123B	21	100	0	0	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
FANCA	20	95	1	5	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
FANCC	21	100	0	0	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
FANCG	21	100	0	0	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
FANCL	20	95	1	5	4	80	1	20	4	100	0	0	1	100	0	0
FBXW7	21	100	0	0	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
FGF19	21	100	0	0	4	80	1	20	4	100	0	0	1	100	0	0
FGF23	21	100	0	0	4	80	1	20	4	100	0	0	1	100	0	0
FGF6	20	95	1	5	4	80	1	20	4	100	0	0	1	100	0	0
FGFR3	20	95	1	5	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
FGFR4	21	100	0	0	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
FLCN	20	95	1	5	5	100	0	0	3	75	1	25	1	100	0	0
FLT1	19	90	2	10	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
FLT3	20	95	1	5	5	100	0	0	3	75	1	25	1	100	0	0
GABRA6	20	95	1	5	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
GATA4	21	100	0	0	4	80	1	20	4	100	0	0	1	100	0	0
GNAS	21	100	0	0	4	80	1	20	4	100	0	0	1	100	0	0
GRM3	20	95	1	5	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
GSK3B	21	100	0	0	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
HGF	19	90	2	10	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
HSD3B1	20	95	1	5	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
ID3	21	100	0	0	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
IKZF1	21	100	0	0	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
INPP4B	20	95	1	5	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
IRF4	20	95	1	5	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
IRS2	21	100	0	0	4	80	1	20	4	100	0	0	1	100	0	0
JAK2	20	95	1	5	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
JAK3	21	100	0	0	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
KDM5A	21	100	0	0	4	80	1	20	4	100	0	0	1	100	0	0
KEL	19	90	2	10	4	80	1	20	4	100	0	0	1	100	0	0
KLHL6	20	95	1	5	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
KMT2AMLL	20	95	1	5	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
KRAS	21	100	0	0	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
LTK	19	90	2	10	5	100	0	0	3	75	1	25	1	100	0	0
MAP2K1MEK1	21	100	0	0	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
MAP2K2MEK2	21	100	0	0	5	100	0	0	3	75	1	25	1	100	0	0
MAP3K13	20	95	1	5	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
MDM2	20	95	1	5	4	80	1	20	4	100	0	0	1	100	0	0
MDM4	20	95	1	5	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
MED12	19	90	2	10	4	80	1	20	4	100	0	0	1	100	0	0
MEF2B	20	95	1	5	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
MET	21	100	0	0	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
MLH1	19	90	2	10	4	80	1	20	4	100	0	0	1	100	0	0
MPL	20	95	1	5	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
MRE11A	20	95	1	5	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0

Genes	GB				AA				OAA				OA			
	No		Si		No		Si		No		Si		No		Si	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
MSH2	18	86	3	14	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
MSH3	19	90	2	10	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
MSH6	21	100	0	0	4	80	1	20	4	100	0	0	1	100	0	0
MTAP	18	86	3	14	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
MUTYH	18	86	3	14	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
MYD88	20	95	1	5	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
NF2	20	95	1	5	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
NOTCH2	20	95	1	5	4	80	1	20	3	75	1	25	1	100	0	0
NOTCH3	18	86	3	14	4	80	1	20	4	100	0	0	1	100	0	0
NRAS	21	100	0	0	4	80	1	20	4	100	0	0	1	100	0	0
NTRK1	21	100	0	0	4	80	1	20	3	75	1	25	1	100	0	0
NTRK2	20	95	1	5	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
PARP2	21	100	0	0	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
PAX5	21	100	0	0	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
PBRM1	21	100	0	0	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
PDCD1LG2PDL2	20	95	1	5	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
PIK3C2B	19	90	2	10	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
PIK3C2G	21	100	0	0	4	80	1	20	4	100	0	0	1	100	0	0
PIK3CA	20	95	1	5	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
PIK3R1	20	95	1	5	4	80	1	20	4	100	0	0	1	100	0	0
PMS2	20	95	1	5	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
POLD1	20	95	1	5	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
PPARG	21	100	0	0	4	80	1	20	4	100	0	0	1	100	0	0
PPP2R1A	20	95	1	5	5	100	0	0	3	75	1	25	1	100	0	0
PRKCI	20	95	1	5	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
PTCH1	20	95	1	5	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
PTEN	18	86	3	14	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
PTPN11	19	90	2	10	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
PTPRO	21	100	0	0	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
QKI	21	100	0	0	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
RAC1	21	100	0	0	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
RAD21	21	100	0	0	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
RAD51D	20	95	1	5	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
RAD52	21	100	0	0	4	80	1	20	4	100	0	0	1	100	0	0
RAD54L	20	95	1	5	5	100	0	0	3	75	1	25	1	100	0	0
RB1	18	86	3	14	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
RBM10	21	100	0	0	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
REL	21	100	0	0	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
RET	19	90	2	10	4	80	1	20	4	100	0	0	1	100	0	0
RICTOR	20	95	1	5	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
SDHA	21	100	0	0	5	100	0	0	3	75	1	25	1	100	0	0
SDHB	21	100	0	0	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
SETD2	18	86	3	14	5	100	0	0	3	75	1	25	1	100	0	0
SGK1	20	95	1	5	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
SMAD2	21	100	0	0	4	80	1	20	4	100	0	0	1	100	0	0
SMAD4	21	100	0	0	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
SMARCA4	20	95	1	5	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
SNCAIP	20	95	1	5	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
SOX2	21	100	0	0	4	80	1	20	4	100	0	0	1	100	0	0
SOX9	20	95	1	5	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
STAG2	19	90	2	10	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
STAT3	20	95	1	5	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
STK11	21	100	0	0	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
SYK	21	100	0	0	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
TBX3	21	100	0	0	5	100	0	0	3	75	1	25	1	100	0	0
TEK	19	90	2	10	4	80	1	20	4	100	0	0	1	100	0	0
TET2	21	100	0	0	4	80	1	20	3	75	1	25	1	100	0	0
TGFBR2	21	100	0	0	4	80	1	20	4	100	0	0	1	100	0	0
TSC2	20	95	1	5	5	100	0	0	3	75	1	25	1	100	0	0
U2AF1	19	90	2	10	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
VHL	21	100	0	0	4	80	1	20	4	100	0	0	1	100	0	0
WHSC1MMSET	21	100	0	0	5	100	0	0	4	100	0	0	1	100	0	0
ZNF703	19	90	2	10	5	100	0	0	3	75	1	25	1	100	0	0

7.2 Relación entre la presencia de los genes y la segunda recaída.

En este apartado del informe se presenta el análisis comparativo entre la variable dependiente “segunda recaída” (a los 22 meses) y la presencia de genes medidos por medio del perfilamiento. Para el momento de la segunda recaída a los 22 meses se presentaron 17 eventos, en los que se detectó la mutación en 74 genes. (Tabla 15).

Los genes encontrados con mayor significancia fueron *PIK3C2 β* con un HR de 13,81 (IC95% 2,258-84,45, $p=0,004$), *NOTCH3* con un HR de 6,026 (IC95% 1,742-20,84, $p=0,005$), *KIT* con un HR de 3,985 (IC95% 1,204-13,18, $p=0,024$), *ERBB3* con un HR de 3,871 (IC95% 1,066-14,04, $p=0,04$) y *MLH1* con un HR de 3,528 (IC95% 0,950-13,09, $p=0,06$) (Tabla 15).

Tabla 15. Genes relacionados con la segunda recaída. Se relacionan los genes relacionados con la segunda recaída, luego de PS y dosis metronómicas de temozolomida.

Gen	Presencia del Gen		Valor p	HR IC 95%
	Si	No		
PIK3C2B	2(11,7)	15(88,2)	0,004	13,81 (2,258 - 84,45)
NOTCH3	4(23,5)	13(76,4)	0,005	6,026 (1,742 - 20,84)
KIT	4(23,5)	13(76,4)	0,024	3,985 (1,204 - 13,18)
ERBB3	3(17,6)	14(82,3)	0,04	3,871 (1,066 - 14,04)
MLH1	3(17,6)	14(82,3)	0,06	3,528 (0,950 - 13,09)
MDM2	2(11,7)	15(88,2)	0,096	3,744 (0,789 - 17,75)
CDK4	2(11,7)	15(88,2)	0,096	3,744 (0,789 - 17,75)
TERT	12(70,5)	5(29,4)	0,099	2,428 (0,846 - 6,963)
NOTCH1	3(17,6)	14(82,3)	0,103	2,926 (0,804 - 10,65)
STAG2	2(11,7)	15(88,2)	0,137	3,107 (0,698 - 13,82)
RB1	3(17,6)	14(82,3)	0,222	2,286 (0,611 - 7,821)
DIS3	1(5,88)	16(94,1)	0,255	0,308 (0,040 - 2,333)
KDR	1(5,88)	16(94,1)	0,255	0,308 (0,040 - 2,333)
EGFR	10(58,8)	7(41,1)	0,26	1,755 (0,659 - 4,672)
PDGFRA	10(58,8)	7(41,1)	0,26	1,755 (0,659 - 4,672)
SPEN	3(17,6)	14(82,3)	0,272	0,496 (0,141 - 1,734)
ATRX	1(5,88)	16(94,1)	0,273	0,323 (0,042 - 2,439)
CBL	2(11,7)	15(88,2)	0,284	2,251 (0,509 - 9,941)
RPTOR	1(5,88)	16(94,1)	0,308	0,349 (0,046 - 2,641)
AR	2(11,7)	15(88,2)	0,315	2,167 (0,478 - 9,808)
RAD54L	2(11,7)	15(88,2)	0,33	2,085 (0,475 - 9,148)
EP300	4(23,5)	13(76,4)	0,332	1,745 (0,567 - 5,373)

Gen	Presencia del Gen		Valor p	HR IC 95%
	Si	No		
MSH2	2(11,7)	15(88,2)	0,345	2,046 (0,463 - 9,034)
PIK3R1	2(11,7)	15(88,2)	0,373	1,962 (0,444 - 8,664)
SETD2	3(17,6)	14(82,3)	0,383	1,743 (0,499 - 6,078)
NOTCH2	1(5,88)	16(94,1)	0,401	0,420 (0,055 - 3,179)
TEK	2(11,7)	15(88,2)	0,412	1,857 (0,423 - 8,154)
ZNF703	1(5,88)	16(94,1)	0,419	0,434 (0,057 - 3,281)
TET2	2(11,7)	15(88,2)	0,422	1,833 (0,418 - 8,040)
TSC1	4(23,5)	13(76,4)	0,468	0,659 (0,214 - 2,027)
CREBBP	1(5,88)	16(94,1)	0,47	0,474 (0,062 - 3,582)
KEL	1(5,88)	16(94,1)	0,47	0,474 (0,062 - 3,582)
MLL2	2(11,7)	15(88,2)	0,494	0,597 (0,136 - 2,620)
ROS1	1(5,88)	16(94,1)	0,519	0,514 (0,068 - 3,884)
CIC	3(17,6)	14(82,3)	0,521	1,506 (0,431 - 5,261)
NF1	4(23,5)	13(76,4)	0,526	1,437 (0,468 - 4,415)
MTAP	1(5,88)	16(94,1)	0,536	0,527 (0,069 - 3,985)
MUTYH	1(5,88)	16(94,1)	0,536	0,527 (0,069 - 3,985)
POLE	2(11,7)	15(88,2)	0,546	0,634 (0,144 - 2,779)
PTEN	1(5,88)	16(94,1)	0,567	0,554 (0,733 - 4,185)
ABL1	2(11,7)	15(88,2)	0,58	1,519 (0,345 - 6,678)
MED12	1(5,88)	16(94,1)	0,583	0,567 (0,075 - 4,288)
BTK	1(5,88)	16(94,1)	0,615	0,594 (0,786 - 4,497)
CDKN2A/B	4(23,5)	13(76,4)	0,643	1,304 (0,423 - 4,022)
NTRK1	1(5,88)	16(94,1)	0,646	0,622 (0,082 - 4,710)
HGF	1(5,88)	16(94,1)	0,68	0,653 (0,086 - 4,943)
FLT1	1(5,88)	16(94,1)	0,714	0,685 (0,090 - 5,182)
U2AF1	1(5,88)	16(94,1)	0,714	0,685 (0,090 - 5,182)
RET	2(11,7)	15(88,2)	0,73	1,297 (0,294 - 5,710)
PPP2R1A	1(5,88)	16(94,1)	0,782	0,751 (0,099 - 5,677)
BCOR	2(11,7)	15(88,2)	0,815	1,192 (0,272 - 5,227)
ESR1	1(5,88)	16(94,1)	0,815	0,785 (0,103 - 5,936)
ALK	3(17,6)	14(82,3)	0,818	1,157 (0,332 - 4,032)
ARID1A	2(11,7)	15(88,2)	0,822	0,844 (0,192 - 3,697)
CARD11	1(5,88)	16(94,1)	0,858	1,203 (0,159 - 9,102)
CCND2	1(5,88)	16(94,1)	0,882	0,857 (0,113 - 6,479)
KEAP1	1(5,88)	16(94,1)	0,882	0,857 (0,113 - 6,479)
MAF	1(5,88)	16(94,1)	0,882	0,857 (0,113 - 6,479)
IDH1	11(64,7)	6(35,2)	0,89	1,072 (0,395 - 2,911)
MSH3	1(5,88)	16(94,1)	0,89	1,153 (0,152 - 8,722)
FANCL	1(5,88)	16(94,1)	0,923	1,105 (0,146 - 8,359)
TP53	7(41,1)	10(58,8)	0,946	0,967 (0,367 - 2,544)
FGFR1	1(5,88)	16(94,1)	0,948	0,934 (0,123 - 7,062)
MAP3K1	1(5,88)	16(94,1)	0,948	0,934 (0,123 - 7,062)
AXIN1	1(5,88)	16(94,1)	0,955	1,059 (0,140 - 8,012)
AXL	0(0)	17(100)	IND	IND
BRD4	0(0)	17(100)	IND	IND
CDH1	0(0)	17(100)	IND	IND
LTK	0(0)	17(100)	IND	IND

Gen	Presencia del Gen		Valor p	HR IC 95%
	Si	No		
DNMT3A	0(0)	17(100)	IND	IND
FGF6	0(0)	17(100)	IND	IND
FLCN	0(0)	17(100)	IND	IND
FLT3	0(0)	17(100)	IND	IND
TSC2	0(0)	17(100)	IND	IND
TYRO3	0(0)	17(100)	IND	IND

7.3 Genes identificados en el perfilamiento que mejor explican la segunda recaída.

Para la construcción del modelo más parsimonioso, o sea el que mejor explicara la segunda recaída, luego del uso de temozolomida en el PS y metronómica a la primera recaída, se fueron retirando uno a uno los genes que tenían la menor significancia (Anexo 2). Se obtuvo el modelo final, que incluye 4 genes PIK3C2B, ERBB3, KIT y MLH1 relacionados con la segunda recaída, luego del uso de temozolomida como parte del protocolo Stupp y a dosis metronómicas (Tabla 16).

Tabla 16. Modelo final: genes relacionados con la segunda recaída. Análisis multivariado para identificar los genes mutados asociados a la segunda recaída, tras el uso de temozolomida según PS y TMZm, en pacientes con HGG.

Gen	Valor p	HRc IC 95%	Valor p	HRa IC 95%
PIK3C2B	0,004	13,81 (2,258 - 84,45)	0,000	82,37 (8,36 - 811,67)
KIT	0,024	3,985 (1,204 - 13,18)	0,002	10,24 (2,42 - 43,34)
ERBB3	0,04	3,871 (1,066 - 14,04)	0,001	13,20 (2,77 - 62,77)
MLH1	0,06	3,528 (0,950 - 13,09)	0,006	8,50 (1,83 - 39,45)

Según los análisis estadísticos se encontró que los genes que más se relacionaron con la resistencia al tratamiento con temozolomida en los pacientes con HGG fueron; *PIK3C2β* (HR: 82.37, IC95% 8.36-811.67, p=0,000); *ERBB3* (HR: 13.2, IC95% 2.77-62.77, p=0,001), *KIT* (HR 10.24, IC95% 2.41-43.34, p 0.002) y *MLH1* (HR: 8.50, IC95% 1.83-39.45, p=0,006).

Las mutaciones que se encontraron para *PIK3C2β* fueron una conductora (amplificación) y dos mutaciones de significado desconocido (un rearreglo y R458Q). Para *ERBB3* se encontraron dos mutaciones de significado desconocido (L1177I y R164K). Para *KIT* se encontraron dos mutaciones conductoras (una amplificación

equivoca y una amplificación y dos mutaciones de significado desconocido (L15P y V950M) y para MLH1 una mutación conductora (F261fs*31 y una de significado desconocido (L607) (Tabla 17).

Tabla 17. Mutaciones específicas de los genes que conforman el modelo.

MUTACION	HR	P	Muestra	Mutación conductora	Mutación de significado desconocido
<i>PIK3C2β</i>	82.37 (95%IC 8.36-811.67)	0.000	15 24	Amplificación	Rearreglo R458Q
<i>ERBB3</i>	13.20 (95%IC 2.77- 62.77)	0.001	3 14		L1177I R164K
<i>KIT</i>	10.24 (95%IC 2.41-43.34)	0.002	4 7 10 31	Amplificación equivocada Amplificación	L15P V950M
<i>MLH1</i>	8.50 (95%IC 1.83-39.45)	0.006	16 18	F261fs*31	L607

Se relacionan las mutaciones relacionadas con la segunda recaída.

Como parte de este análisis se realizó una curva de supervivencia mediante el método de Kaplan-Meier en pacientes que presentaban mutaciones en los cuatro genes (*PIK3C2B*, *ERBB3*, *KIT* y *MLH1*). Este análisis se realizó para estimar el tiempo que tardan los pacientes en alcanzar una segunda recaída después del tratamiento con temozolomida metronómica en comparación con pacientes sin mutaciones en estos genes. Al analizar los resultados de las curvas de supervivencia de los pacientes que presentaban mutaciones, se observó que presentaban la segunda recaída en un tiempo menor en comparación con los pacientes que no presentaban mutaciones en estos cuatro genes, como se puede observar en Figura 29.

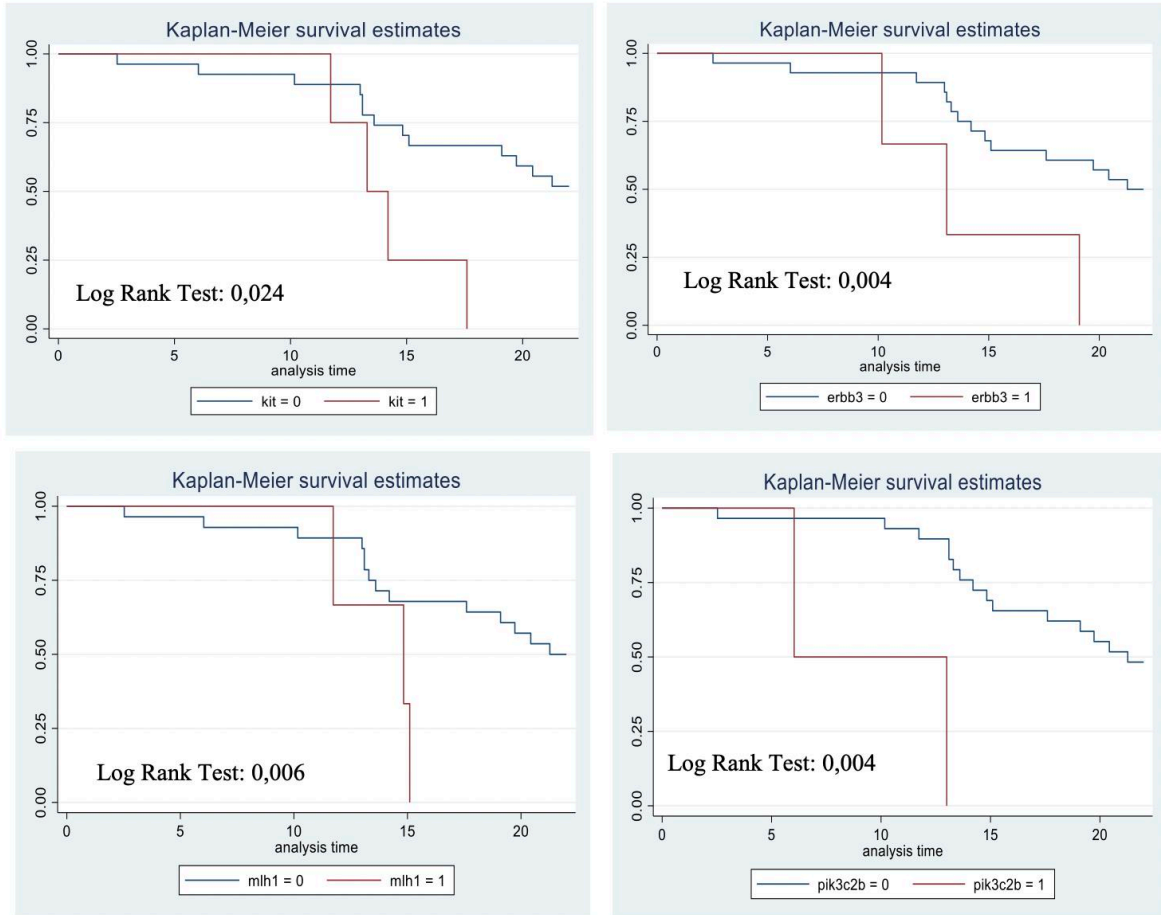


Figura 29: Curvas de supervivencia según el método de Kaplan-Meier. Este análisis se realizó para estimar el tiempo que tardan los pacientes con y sin mutaciones en los genes PIK3C2B, KIT, ERBB3 y MLH1 en presentar una segunda recaída después del tratamiento con temozolomida metronómica. El gráfico muestra pacientes sin mutaciones con líneas azules, mientras que las líneas rojas representan pacientes con mutaciones, observándose que los pacientes con mutaciones presentan una segunda recaída antes. El símbolo 0 representa pacientes sin mutaciones y el símbolo 1 representa pacientes con mutaciones. El eje Y representa la tasa de supervivencia y el eje X muestra el tiempo en meses.

7.4 *Análisis de los genes relacionados con la segunda recaída a partir de la bioinformática*

Con base en los genes mutados PIK3C2B, ERBB3, KIT y MLH1 que se encontraron relacionados con la segunda recaída después del uso de temozolomida según el protocolo Stupp y la administración de una dosis metronómica, se realizó el análisis bioinformático in-silico. Como primer análisis, se detectaron los dominios funcionales en las cuatro proteínas codificadas por genes mutados y si las diferentes mutaciones encontradas les afectaban. Encontrando que para la proteína PIK3C2B, el dominio (PI3K_Ras-bd_dom) estaba afectado; para la proteína ERBB3, el dominio (Rcp_L) se vio afectado; para la proteína KIT, no se encontraron mutaciones que afectaran a los dominios funcionales; y para la proteína MLH1, dos dominios estaban afectados (DNA_mismatch_repair_N y DNA_mismatch_S5_2-like). Además, el proceso biológico, la función molecular y los componentes celulares de las proteínas codificadas por los cuatro genes mutados se describen en la Tabla 18.

Tabla 18. Características de proteínas relacionadas con la segunda recaída. La siguiente tabla muestra los dominios, procesos biológicos, función molecular y componentes celulares de las cuatro proteínas relacionadas con la segunda recaída después de usar temozolomida según el protocolo Stupp y una dosis metronómica en pacientes con gliomas de alto grado.

Gene	Dominios	Procesos biológicos	Función molecular	Componente celular
PIK3C2B	- Mutación R458Q afecta dominio (PI3K_Ras-bd_dom) - Amplificación - Reordenamiento	- Señalización mediada por fosfatidilinositol - Proceso biosintético de fosfatidilinositol fosfatasa	- Unión de fosfatidilinositol - actividad quinasa	Ninguno
ERBB3	- La mutación R164K afecta al dominio (Rcp_L) - L1177I la mutación no afecta ningún dominio funcional	- Vía de señalización de la proteína tirosina quinasa del receptor de membrana. - Fosforilación de proteínas	- Actividad de la proteína quinasa - Actividad de la proteína tirosina quinasa - Unión de ATP	Membrana
KIT	- Amplificación - Amplificación errónea	- Fosforilación de proteínas - Vía de señalización de la proteína tirosina quinasa del receptor transmembrana - Vía de señalización del kit - Vía de señalización del receptor Fc	- Unión de ATP - Receptor transmembrana - Actividad de la proteína tirosina quinasa - Actividad de la proteína quinasa - Unión de citoquinas - Actividad de la proteína tirosina quinasa	Ninguno
MLH1	- (F261fs*7) la mutación afecta al dominio (DNA_mismatch_repair_N and DNA_mismatch_S5_2-like)	Reparación de desajustes de ADN	- Unión de ADN no coincidente - Unión de ATP - Actividad del sensor de daños en el ADN dependiente de ATP - Actividad de hidrólisis de ATP	Complejo de reparación de desajustes

Construcción propia

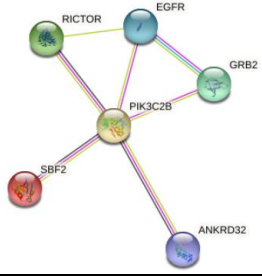
Paralelamente, se identificaron las interacciones y rutas metabólicas de las proteínas. La proteína PIK3C2B interactúa con cinco proteínas (RICTOR, EGFR, GRB2, ANKRD32 y SBF2) y participa en cinco vías metabólicas (respuesta al daño del ADN (solo el dependiente de ATM); adhesión focal: vía de señalización PI3K-Akt-mTOR; vías de señalización del glioblastoma; metabolismo de fosfoinosítidos y regulación del citoesqueleto de actina). La proteína ERBB3 interactúa con cinco proteínas (ERBB2, EGFR, NNRG1, GRB2 y SHC1) y participa en cinco vías metabólicas: red relacionada con la apoptosis debido a la alteración de Notch3 en el cáncer de ovario; resistencia al inhibidor de la tirosina quinasa del EGFR; la vía de señalización de ErbB; vías de señalización de glioblastoma y desarrollo del corazón).

La proteína KIT interactúa con cinco proteínas (PIK3R1, PLCG1, KITLG, GRB2 y CRK) y participa en cinco rutas metabólicas: la ruta del cáncer de mama; la diferenciación de progenitores cardíacos; la adhesión focal: PI3K-Akt-ruta de señalización de mTOR; la vía de señalización de gastrina y vías de regulación de señalización de hipopótamo. La proteína MLH1 interactúa con cinco proteínas (MSH2, PMS2, PMS1, BLM y EXO1) y participa en cinco vías metabólicas: inestabilidad cromosómica y de microsatélites en el cáncer colorrectal; daño por infrarrojos en el ADN y respuesta celular a través de ATR; falla en el sistema de reparación de desajustes; vías de reparación del ADN, red completa e infertilidad ovárica (Tabla 17).

Tabla 19. Interacciones y rutas metabólicas de las proteínas. Identificación de las interacciones proteína-proteína y las vías metabólicas de las proteínas codificadas por los 1 cuatro genes mutados relacionados con la segunda recaída tras el uso de temozolomida según el protocolo Stupp y la 2 administración de dosis metronómicas en pacientes con gliomas de alto grado.

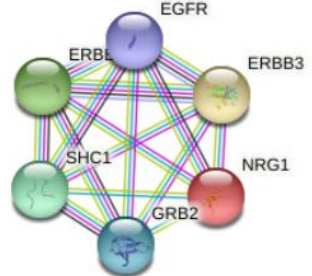
Gen	Interacciones proteína-proteína	Rutas metabólicas
<i>PIK3C2B</i>	RICTOR, EGFR, GRB2, ANKRD32, SBF2	<ul style="list-style-type: none"> - Respuesta al daño del ADN (solo dependiente de ATM) - Adhesión focal: vía de señalización PI3K-Akt-mTOR - Vías de señalización del glioblastoma - Metabolismo de los fosfoinosítidos - Regulación del citoesqueleto de actina

Gen	Interacciones proteína-proteína	Rutas metabólicas
-----	---------------------------------	-------------------



ERBB2, EGFR, NNRG1, GRB2, SHC1

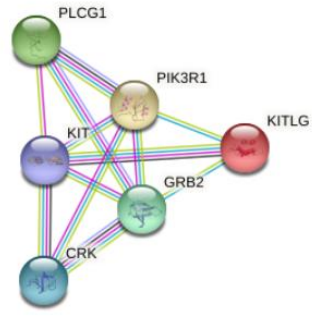
ERBB3



- Red relacionada con la apoptosis debido a Notch3 alterado en el cáncer de ovario
- Resistencia al inhibidor de la tirosina quinasa del EGFR
- Vía de señalización de ERBB
- Vías de señalización del glioblastoma
- Desarrollo del corazón

PIK3R1, PLCG1, KITLG, GRB2, CRK

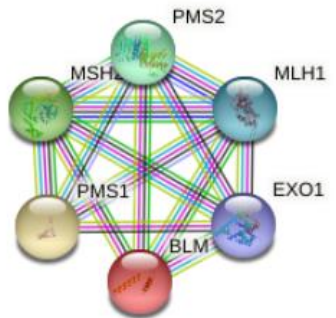
KIT



- Vía del cáncer de mama
- Diferenciación de progenitores cardíacos
- Adhesión focal: vía de señalización PI3K-Akt-mTOR
- Vía de señalización de la gastrina
- Vías de regulación de la señalización del hipotálamo

MSH2, PMS2, PMS1, BLM, EXO1

MLH1



- Inestabilidad cromosómica y de microsatélites en el cáncer colorrectal
- Daño IR del ADN y respuesta celular a través de ATR
- Reparación de desajustes de ADN
- Vías de reparación de ADN, red completa
- Infertilidad ovárica

Fuente: construcción propia

Posteriormente, se modeló la estructura tridimensional de cada una de las cuatro proteínas y se determinó el efecto estructural provocado por cada una de las mutaciones.

La proteína PIK3C2B está compuesta por 1,634 aminoácidos; tiene un peso molecular de 184739.79 Da; un punto isoeléctrico teórico de 6,87; 194 residuos con carga negativa (Asp + Glu); 189 residuos con carga positiva (Arg + Lys); una composición atómica de 8246 carbono, 12875 hidrógeno, 2281 nitrógeno, 2414 oxígeno y 67 átomos de azufre; una vida media estimada de 30 horas (reticulocitos de mamíferos, in vitro). Su índice de inestabilidad se calcula en 46,22 y se clasifica como inestable.

La mutación R458Q se detectó en la proteína. El aminoácido de tipo salvaje es una arginina (R) que se clasifica como básica, que se reemplaza por una glutamina (Q) que es hidrófila. De acuerdo con los resultados de PolyPhen-2 (predicción de efectos funcionales de nsSNP humanos), se prevé que esta mutación sea probablemente dañina con una puntuación de 0,979 (sensibilidad: 0,76; especificidad: 0,96). Según los resultados de SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant), se predice que la sustitución en la posición 458 de R a Q será tolerada con una puntuación de 0,45. No se detectó ningún péptido señal usando el programa de bioinformática SignalP (versión 6.0). El efecto de la mutación sobre la estructura de la proteína conduce al acortamiento del radical, reduciendo las fuerzas de Van der Waals, lo que posiblemente afecta la atracción entre átomos, moléculas y superficies. A nivel estructural, la mutación se ubica entre los aminoácidos (457-464) que forman una lámina beta, generando una elongación de la lámina beta en la proteína mutada. Todas estas alteraciones pueden dar lugar a inestabilidad y pérdida de funcionalidad de la proteína (Tabla 20).

La proteína ERBB3 está compuesta por 1342 aminoácidos; tiene un peso molecular de 148098.19 Da; un punto isoeléctrico teórico de 6.11; 154 residuos cargados negativamente (Asp + Glu); 132 residuos cargados positivamente (Arg + Lys); una composición atómica de 6447 átomos de carbono, 10126 de hidrógeno, 1852 de nitrógeno, 1969 de oxígeno y 94 de azufre; una vida media estimada de 30 horas (reticulocitos de mamíferos, in vitro). Su índice de inestabilidad se calcula en 49,61 y clasifica se clasifica como inestable.

Se detecto la mutación R164K en la proteína. El aminoácido de tipo salvaje es una arginina (R) que se clasifica como básica, que se reemplaza por una lisina (K) que es hidrófila. Según los resultados de PolyPhen-2, se prevé que esta mutación sea probablemente benigna con una puntuación de 0,017 (sensibilidad: 0,95; especificidad: 0,80). Según los resultados de la sustitución de SIFT en la posición

164 de R a K, se predice que se tolerará con una puntuación de 0,64. No se detectó ningún péptido señal usando el programa de bioinformática SignalP (versión 6.0). A nivel estructural se observa un cambio de aminoácido que lleva a una alteración en la orientación del grupo radical que altera la distribución espacial de las fuerzas de Van der Waals, lo que posiblemente afecta las atracciones entre átomos, moléculas y superficies (Tabla 20).

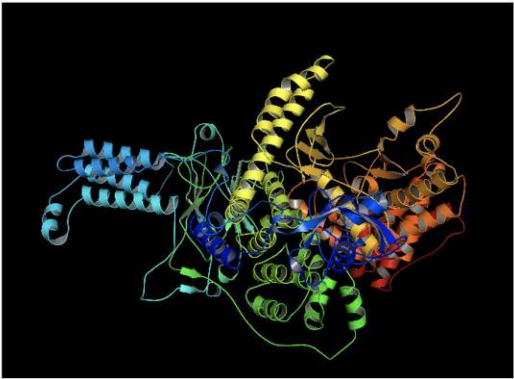
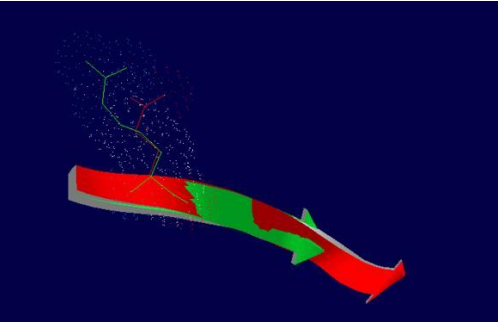
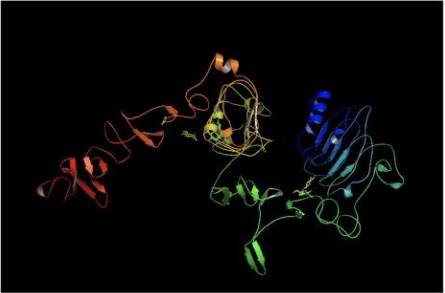
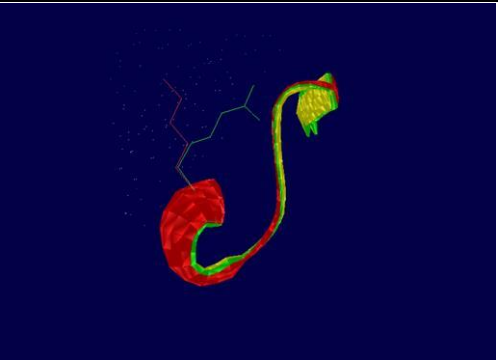
La proteína KIT está compuesta por 977 aminoácidos; tiene un peso molecular de 109992,70 Da; un punto isoeléctrico teórico de 6,54; 111 residuos cargados negativamente (Asp + Glu); 106 residuos cargados positivamente (Arg + Lys); una composición atómica de 4925 átomos de carbono, 7657 de hidrógeno, de hidrógeno, 1301n, 1460 de oxígeno y 48 de azufre; y una vida media estimada de 30 horas (reticulocitos de mamíferos, in vitro). Su índice de inestabilidad se calcula en 39,43 y se clasifica en como estable.

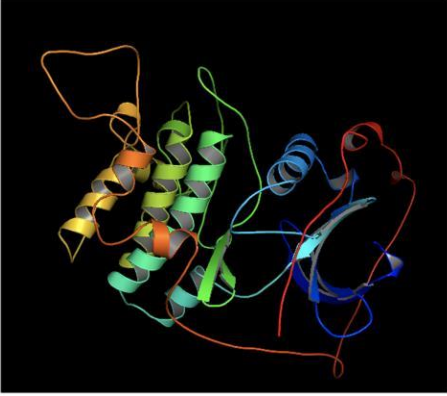
No se detectó ningún péptido señal usando el programa de bioinformática SignalP (versión 6.0). Esta proteína no presentaba una alteración estructural pero sí un aumento del número de copias del gen KIT en el genoma del paciente. Este fenómeno genético es común en las células cancerosas, que produce varias copias de uno o más genes en respuesta a señales de otras células o del entorno.

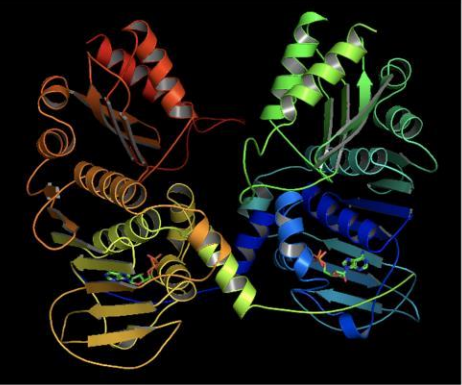

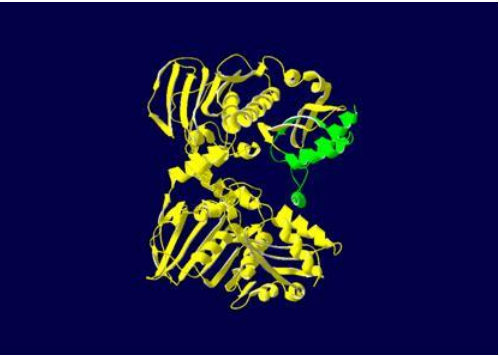
La proteína MLH1 está compuesta por 756 aminoácidos; tiene un peso molecular de 84600 Da; un punto isoeléctrico teórico de 5,51; 104 residuos con carga negativa (Asp + Glu), 83 residuos con carga positiva (Arg + Lys); una composición atómica de 3740 átomos de carbono, 5947 de hidrógeno, 1017 de nitrógeno, 1165 de oxígeno y 25 de azufre, y una vida media estimada de 30 horas (reticulocitos de mamíferos, in vitro). Su índice de inestabilidad se calcula en 51,29 y se clasifica como inestable.

Se detectó la mutación F261fs*31 en la proteína. No se detectó el péptido señal usando el programa de bioinformática SignalP (versión 6.0). La delección de una citocina en la posición 783 del gen MLH1 (783delC) conduce a un cambio estructural en la proteína MLH1 (p.Phe261fs*7). Este cambio de secuencia crea una señal de parada traduccional prematura de 7 aminoácidos después de la fenilalanina (Frameshift). Se espera que resulte en un producto de proteína ausente o alterado (esto podría conducir a la producción de una proteína truncada de 268 aminoácidos) (Tabla 20).

Tabla 20. Análisis estructural de los efectos de las mutaciones. Análisis estructural del efecto de las mutaciones en las cuatro proteínas codificadas por genes mutados relacionados con la recaída tras el uso de temozolomida según protocolo Stupp y dosis metronómica en pacientes con gliomas de alto grado. La primera columna muestra el nombre de la proteína y la mutación encontrada. La segunda columna muestra el modelado estructural de la proteína de tipo salvaje. La tercera columna muestra el efecto de las mutaciones en la estructura de la proteína.

Gen	Proteína normal	Proteína mutada
<p>PIK3C2B</p> <p>R458Q mutación</p>	<p>PIK3C2B</p> 	 <p>El efecto de la mutación sobre la estructura de la proteína conduce al acortamiento del radical, reduciendo las fuerzas de Van der Waals. A nivel estructural, la mutación se localiza entre los aminoácidos (457-464) que componen una hoja beta, generando un alargamiento de la hoja beta en la proteína mutada.</p>
<p>ERBB3</p> <p>R164K mutación</p>	<p>ERBB3-1</p> 	 <p>A nivel estructural se observa un cambio de aminoácido que conduce a una alteración en la orientación del grupo radical que altera la distribución espacial de las fuerzas de Van der Waals.</p>

Gen	Proteína normal	Proteína mutada
	<p data-bbox="516 226 574 247">ERBB3-2</p>  <p data-bbox="321 701 639 730">Proteína con patrón de dos partes.</p>	

<p data-bbox="224 1262 285 1291"><i>MLH1</i></p> <p data-bbox="224 1329 315 1381">F261fs*31 mutación</p>	<p data-bbox="532 921 581 942">MLH1-1</p>  <p data-bbox="509 1346 558 1367">MLH1-2</p>  <p data-bbox="321 1745 639 1774">Proteína con patrón de dos partes.</p>	 <p data-bbox="824 1398 1395 1507">El color amarillo muestra la región común entre la proteína de tipo salvaje y la mutada, el color verde muestra la región que se perdería en la proteína mutada por la aparición de un codón de parada prematuro.</p>
--	--	--

Construcción propia

Finalmente, las enfermedades asociadas con cada uno de los cuatro genes mutados se identifican utilizando la base de datos OMIM (Catálogo en línea de genes humanos y trastornos genéticos). Las mutaciones en el gen que codifica la proteína PIK3C2B se han asociado con las siguientes enfermedades: glioma de alto grado, Maffucci y hepatitis C. Las mutaciones en el gen que codifica la proteína ERBB3 se han asociado con las siguientes enfermedades: glioma de alto grado, cáncer de mama, mielinización frontal, sistema nervioso entérico y diabetes tipo 1. Las mutaciones en el gen que codifica la proteína KIT se han asociado con las siguientes enfermedades: glioma de alto grado, piebaldismo, enfermedades gastrointestinales tumor del estroma (GIST), mastocitosis, autoanticuerpo de la membrana celular del hígado (LMA), melanoma y tumores de células germinales.

Las mutaciones en el gen que codifica la proteína MLH1 se han asociado con las siguientes enfermedades: glioma de alto grado, cáncer colorrectal hereditario sin poliposis (Lynch) y síndrome de Turcot tipo I (Tabla 21).

Tabla 21. Enfermedades asociadas a cada uno de los genes mutados. Enfermedades relacionadas con los cuatro genes mutados relacionados con segunda recaída tras el uso de temozolomida según el protocolo de Stupp y la dosis metronómica en pacientes con gliomas de alto grado. La primera columna muestra los nombres de los genes. La segunda columna muestra las enfermedades relacionadas con mutaciones en los genes *PIK3C2B*, *ERBB3*, *KIT* y *MLH1*.

Gen	Enfermedades asociadas
<i>PIK3C2B</i>	<ul style="list-style-type: none"> -Glioma de alto grado -Maffucci -Hepatitis C
<i>ERBB3</i>	<ul style="list-style-type: none"> -Glioma de alto grado -Cáncer de mama -Mielinización frontal -Sistema nervioso entérico -Diabetes tipo 1
<i>KIT</i>	<ul style="list-style-type: none"> -Glioma de alto grado -Piebaldismo -GIST -Mastocitosis -LMA

Gen	Enfermedades asociadas
	-Melanoma -Tumores de células germinales
<i>MLH1</i>	-Glioma de alto grado -Cáncer colorectal no polipósico hereditario -Turcot tipo I

Fuente: construcción propia

8 DISCUSIÓN

Según el Registro Central de Tumores Cerebrales de los Estados Unidos (CBTRUS), los gliomas representan el 25% de los tumores primarios del sistema nervioso central en adultos (14). La incidencia de los gliomas es de 5,95 casos/100.000 habitantes al año e incluyen tumores astrocíticos (astrocitomas) y oligodendrogiales (oligodendrogliomas) y pueden ser circunscritos o infiltrantes y estos últimos pueden ser de bajo o alto grado (14).

Estos últimos incluyen el oligodendroglioma anaplásico con una incidencia de 0,11/100.000 habitantes (ahora denominado oligodendroglioma mutado para IDH, con codeleción 1p/19q, grado 3, con la sigla $O^{\text{mut-IDH, codeleción-1p/19q, G3}}$), el astrocitoma anaplásico con una incidencia de 0,41/100.000 habitantes (ahora astrocitoma mutado para IDH, con la sigla $A^{\text{mut-IDH, sin codeleción 1p/19q, G3-4}}$) y el glioblastoma con una incidencia de 3,23/100.000 habitantes (ahora silvestre para IDH, con la sigla $GB^{\text{silv-IDH}}$). El término oligoastrocitoma ha sido retirado de la actual clasificación de la OMS-5^{ed}, 2021 (14). En el rango de edad entre 15 y 39 años predominan los oligodendrogliomas y los astrocitomas. Para los mayores de 40 años, los más frecuentes son los glioblastomas (14). Estos tumores son más prevalentes en hombres que en mujeres (32).

La cohorte analizada de 31 pacientes tenía una edad promedio de 47 años (DE: 14,5) y un 64,5% eran pacientes de sexo femenino, lo cual difiere un poco en relación a lo reportado ya que se esperaría una edad más avanzada ya que predominan los glioblastomas y en la cohorte analizada predominó en el sexo masculino (14), divergencia con la literatura explicada, quizá debido al tamaño de la muestra. Se reportaron antecedentes familiares oncológicos en el 16,1% de los pacientes. En un paciente que tenía neurofibromatosis tipo 1 el glioblastoma fue más agresivo de lo usual, con una SLP a la primera recaída de 3 meses, una SLP a la segunda recaída de 4,5 meses y una OS de 6,4 meses, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura, en relación a la agresividad de los gliomas en los pacientes con este síndrome genético (435). En 2 pacientes con cáncer de mama se descartó Li-Fraumeni (436).

Luego del diagnóstico imagenológico y de mejorar su KPS con corticosteroides en quienes lo ameritaban, se ofreció cirugía a los pacientes, lográndose resección macroscópicamente completa en el 45% de ellos, lo que les confirió un factor pronóstico favorable (437). Con el diagnóstico inicial, se ofreció en promedio a las 4 semanas el protocolo Stupp con temozolomida concomitante a la radioterapia y

temozolomida adyuvante a todos los pacientes, recibiendo el 48% de ellos los 6 ciclos de TMZ adyuvante recomendados. En 11 pacientes se suministraron más de 6 ciclos, ya que persistía la enfermedad macroscópica en el control imagenológico (uno 8 ciclos, uno 11 ciclos y nueve 12 ciclos), práctica común ante la persistencia de la enfermedad, al no tener la TMZ toxicidad acumulativa (438).

Nicholas F Brown y cols. efectuaron un análisis retrospectivo en 490 pacientes con glioblastoma silvestre para IDH en los cuales se había efectuado resección macroscópica completa en el 60% de los pacientes y solo biopsia en el 40% de ellos y posteriormente el 56% recibieron protocolo Stupp, 25% radio/quimioterapia no estándar y 19% quedaron sin tratamiento postoperatorio. En el análisis multivariado, la mayor supervivencia se asoció con la cirugía cito-reductora frente a la biopsia (14,9 frente a 8 meses) (HR 0,54, 95%IC 0,41-0,70). Se asocio también a una mayor supervivencia el tratamiento posterior después del diagnóstico histológico (HR 0,12, 95%IC 0,08-0,16): con protocolo Stupp (16,9 meses) frente a regímenes no estándar (9,2 meses) y frente a ninguno (2,0 meses) (439).

Tradicionalmente, los pacientes con tumores gliales se clasificaban mediante H-E en la que se analiza atipia, actividad mitótica nuclear, aumento en la proliferación glial y vascular, necrosis y pseudo-empalizadas (194), complementando con FISH en búsqueda de la codelección 1p/19q ante la sospecha de un tumor de la estirpe oligodendrogial (440) y con inmunohistoquímica (IHC) para corroborar que las células tumorales derivan de la glía al encontrar expresión de la proteína olig-2 (441) y búsqueda de la proteína alterada como resultado de la mutación en el gen que codifica para la isocitrato deshidrogenasa láctica-1 (IDH) (192), según los criterios de la OMS de 2016 (188). Con base en estos análisis, obtuvimos los siguientes resultados en los 31 pacientes con gliomas de alto grado, 21 glioblastomas, cinco astrocitomas anaplásicos y cinco tumores de la estirpe oligodendrogial (4 oligoastrocitomas anaplásicos y un oligodendroglioma anaplásico) (Figura 24). Actualmente, el diagnóstico de gliomas de alto grado no solo se realiza con H-E, FISH e IHC sino que también incluye la búsqueda de mutaciones genéticas (442), cambios epigenéticos (443) y alteraciones cromosómicas (444).

Como se señaló anteriormente, los estudios de biología molecular son la piedra angular de la nueva clasificación de tumores del sistema nervioso central de la OMS de 2021 (4) y permiten la clasificación de los gliomas de alto grado como el glioblastoma silvestre para la IDH (GB^{silv-IDH}), en el que las mutaciones en el promotor de *TERT*, en el gen *EGFR*, la trisomía del cromosoma 7 y la monosomía

del cromosoma del cromosoma 10 son frecuentes; el astrocitoma mutado para IDH, sin codelección 1p/19q, grado 3 y 4 ($A^{\text{mut-IDH, sin codel 1p/19q, G3-4}}$), en el que se pueden encontrar mutaciones en los genes *ATRX*, *TP53* y *CDKN2A/B*; y el oligodendroglioma con codelección 1p/19q y con mutación de la IDH, grado 3 ($O^{\text{mut-IDH, codel-1p/19q, G3}}$), en el que son comunes las mutaciones del promotor de *TERT*, y de los genes *CIC*, *FUBP-1* y *NOTCH1* (4).

Por lo tanto, se reevaluó el diagnóstico histológico en el grupo de 31 pacientes en quienes se efectuó el perfilamiento genómico analizando 324 genes relacionados con cáncer y en quienes encontramos que había 185 genes mutados y 322 mutaciones diferentes (130 drivers y 192 de significado incierto), lo que nos permitió en los 21 pacientes previamente clasificados como glioblastoma, reclasificarlos y 19 quedaron como $GB^{\text{silv-IDH}}$ y dos cambiaron a $A^{\text{mut-IDH, sin codel 1p/19q, G3-4}}$. De los 5 pacientes previamente diagnosticados como astrocitoma anaplásico, 4 quedaron como $A^{\text{mut-IDH, sin codel 1p/19q, G3-4}}$ y uno quedó como $O^{\text{mut-IDH, codel-1p/19q, G3}}$ y de los 5 pacientes con tumores de la estirpe oligodendroglial, 4 quedaron como $O^{\text{mut-IDH, codel-1p/19q, G3}}$ y uno paso a ser un $A^{\text{mut-IDH, sin codel 1p/19q, G3-4}}$, lo que destaca la importancia de los métodos moleculares para una correcta clasificación de los gliomas de grado (Anexo 3).

Realizar un diagnóstico preciso en estos pacientes nos ayudaría a brindar un tratamiento adecuado, que consiste en la cito reducción quirúrgica lo más amplia posible (445), seguida del Protocolo Stupp (446), excepto el $O^{\text{mut-IDH, codel-1p/19q, G3}}$, en quienes la tendencia es dar temozolomida postoperatoria únicamente, postergando la radioterapia (447).

Además, si se realiza un diagnóstico lo más exacto posible, podríamos explicar con mayor certeza la expectativa de vida del paciente a él y a su familia. En nuestro grupo de pacientes, en el punto de corte del estudio (22 meses), aquellos con glioblastoma tenían una mediana de supervivencia de 29 meses, sin incluir 3 pacientes con sobrevida prolongada (vivos al corte del estudio). Solo 3/5 pacientes con astrocitomas anaplásicos habían fallecido (uno a los 14,5 meses, otro a los 19 meses y el otro a los 87,7 meses), de los 4 pacientes con oligodendroglioma anaplásico solo había fallecido uno de los 4 pacientes a los 45 meses.

La supervivencia, basada en la nueva clasificación de la OMS de 2021, aún no se ha calculado para el $GB^{\text{silv-IDH}}$, el $A^{\text{mut-IDH, sin codel 1p/19q, G3-4}}$ y el $O^{\text{mut-IDH, codel-1p/19q, G3}}$. La percepción de que los pacientes atendidos en el Instituto del Cancerología (Clínica Las Américas-AUNA) respondían mejor al tratamiento puede explicarse en parte por el diagnóstico erróneo realizado. De los pacientes con glioblastoma y que

reciben protocolo Stupp, están vivos a los 2 años el 14,8% y a los 10 años el 2,6% [20]. De los 2 pacientes diagnosticados como glioblastoma según la clasificación de la OMS del 2016 y reclasificados en como $A^{\text{mut-IDH, sin codel 1p/19q, G3-4}}$, uno tuvo una sobrevida de 34 meses y el otro estaba vivo al corte del estudio. De los pacientes con astrocitoma anaplásico, según lo reportado, se espera que estén vivos a los 2 años el 43,3% y a los 10 años el 19% [20] y el paciente diagnosticado como astrocitoma anaplásico, según la clasificación del 2016 y que se reclasifico como $O^{\text{mut-IDH, codel-1p/19q, G3}}$, estaba vivo al corte del estudio. De los pacientes con oligodendroglioma anaplásico, se espera que estén vivos a los dos años el 68,6% y a los 10 años 39,3%, pero el paciente inicialmente rotulado como oligoastrocitoma anaplásico, que se reclasifico luego del perfilamiento genómico a $A^{\text{mut-IDH, sin codel 1p/19q, G3-4}}$, tuvo una sobrevida luego de la cirugía inicial de 45 meses.

Como se anotó, el termino oligoastrocitoma, que tenían inicialmente 4 de los pacientes con tumores de la estirpe oligodendrogial (el quinto tenía diagnóstico de oligodendroglioma anaplásico y falleció a los 32,1 meses), ya no quedo incluido en la nueva clasificación del 2021. Uno de esos 4 pacientes con oligoastrocitoma anaplásico se reclasifico a $A^{\text{mut-IDH, sin codel 1p/19q, G3-4}}$ y falleció a los 45 meses, pero los tres restantes estaban vivos al corte del estudio y no es posible decir, a pesar del perfilamiento pertenecía a la estirpe oligodendrogial o astrocitaria. Es por ello, que se puede inferir que la nueva clasificación OMS del 2021 seguramente sufrirá nuevas modificaciones futuras, a medida que se establezca el verdadero valor de las mutaciones identificadas y se descubran nuevas mutaciones con su respectivo papel.

Los resultados anteriores resaltan la importancia de hacer un buen diagnóstico del tipo de glioma de alto grado para brindar, en asocio a la importancia de la edad, el estado cognitivo al iniciar la concomitancia, el porcentaje de resección quirúrgica, el estado de metilación del promotor de la MGMT y otras alteraciones genómicas pronosticas, información precisa al paciente y a sus familiares sobre el posible desenlace, es decir, la supervivencia general (OS) y el tiempo de supervivencia libre de progresión (PFS), entre otros, para que tengan una noción del tipo de enfermedad que se está enfrentando y se preparen psicológica, social y económicamente, para afrontar esta difícil situación.

El mecanismo de acción de la temozolomida es metilar la posición O6 de las guaninas, lo que da como resultado un desajuste entre las guaninas y las citosinas (emparejamiento de la guanina metilada en la posición O⁶ con la timina), lo que conduce a la activación del sistema MMR (448). Este solo repara la cadena que contiene timina, acumulando las cadenas con guaninas metiladas (449). Por lo tanto, se producen enlaces covalentes intra e inter, formando horquillas que

impiden la replicación celular y conducen a la apoptosis (123). Sin embargo, las células cancerosas tienen un mecanismo para revertir el efecto de la temozolomida a través de la transcripción y posterior traducción de la proteína MGMT, la cual, a través de un grupo sulfhidrilo, elimina el grupo metilo de la O6 metil-guanina, restaurando la guanina a su forma original (450).

La importancia de este biomarcador se refleja al analizar cómo se observó un aumento de la supervivencia (HR: 0,51, 95%, IC: 0,31-0,84) en pacientes cuyo tumor tenía metilado el promotor del gen MGMT, y que recibieron radioterapia y temozolomida, en comparación con aquellos que recibieron solo radioterapia; mientras que los pacientes que no tenían metilación del promotor y que recibieron radioterapia y temozolomida no se observó un aumento significativo en la supervivencia (HR: 0,69, 95%, IC: 0,47-1,02), en comparación con los que solo recibieron radioterapia (7).

En la práctica, la búsqueda de metilación del gen MGMT solo tiene valor pronóstico y no predice una respuesta al tratamiento (7), por lo que todos los pacientes con gliomas de alto grado reciben temozolomida (451). Teóricamente, se debe esperar que los pacientes con metilación del promotor MGMT respondan al 100 % al tratamiento, pero solo se ha observado una disminución del 51 % en el riesgo de muerte. Además, se esperaría que los pacientes sin metilación del promotor de MGMT no respondieran al tratamiento, pero se ha observado una disminución del 31 % en el riesgo de muerte (7). Esto destaca la necesidad de encontrar alteraciones en nuevos genes para mejorar el pronóstico y la respuesta al tratamiento de los pacientes con gliomas de alto grado.

La metilación del promotor se identificó en 17 de los 31 pacientes: 10 glioblastomas, tres astrocitomas anaplásicos y cuatro oligodendrogliomas anaplásicos (Tabla 10). Los datos de metilación obtenidos en este estudio son consistentes con lo que se ha informado en la literatura según tipos diferentes de gliomas de alto grado ya que la metilación del promotor MGMT se encuentra en el 50% de los glioblastomas, en 75 % de astrocitomas anaplásicos, y en casi todos oligodendrogliomas anaplásicos (452). La supervivencia general (OS) en pacientes con gliomas de alto grado con metilación del promotor de glioblastoma en nuestro estudio fue de 59,2 meses, en comparación con 24,6 meses para aquellos sin metilación del promotor.

La supervivencia general no se puede calcular en pacientes con astrocitomas anaplásicos y oligoastrocitomas anaplásicos porque, a los 22 meses (el final de la

investigación), 5/10 pacientes aún estaban vivos; por lo tanto, se analizó la supervivencia libre de progresión (PFS). En la presente investigación, encontramos que la PFS en la primera y segunda recaída fue mayor en pacientes con gliomas que tenían el promotor metilado del gen que codifica la proteína MGMT en comparación con aquellos que no lo tenían (Tabla 10). Estos resultados son consistentes con los informados en la literatura (452). Sin embargo, se requieren nuevos biomarcadores que, en asociación con la metilación del promotor MGMT, permitan predecir la respuesta de los pacientes con glioma de alto grado al uso de temozolomida.

Por ello, en el presente estudio se realizó el perfilamiento genómico analizando en 31 pacientes con glioma de alto grado 324 genes relacionados con cáncer y en quienes encontramos que había 185 genes mutados con 322 mutaciones diferentes (130 drivers y 192 de significado incierto), relacionados con la segunda recaída luego del uso de temozolomida concomitante con la radioterapia y adyuvante como parte del protocolo Stupp y temozolomida metronómica a la primera recaída, para detectar los genes que están relacionados con el pronóstico y e inferir una posible resistencia de los pacientes a la temozolomida.

Como primer análisis estadístico se realizó un análisis bivariado (modelos de regresión de Cox, análisis de Kaplan Meyer y curvas de supervivencia), a través del cual se evaluó la relación de cada gen mutado con la segunda recaída tras el uso de temozolomida. como parte del protocolo Stupp y dosis metronómica, encontrando 71 genes relacionados con la segunda recaída; sin embargo, según los criterios establecidos de $p < 0,25$, solo los genes PIK3C2B ($p=0,004$), NOTCH3 ($p=0,005$), KIT ($p=0,024$), ERBB3 ($p=0,04$), MLH1 ($p=0,06$), MDM2 ($p=0,096$), CDK4 ($p=0,096$), TERT ($p=0,099$), NOTCH1 ($p=0,103$), STAG2 ($p=0,137$) y RB1 ($p=0,222$) estaban relacionados con la segunda recaída a punto de corte de 22 meses.

Como segundo análisis estadístico, se realizó un análisis multivariante y se utilizaron modelos de regresión de Cox para determinar los genes mutados que estaban relacionados con la segunda recaída. Los genes con valores estadísticamente significativos fueron PIK3C2B con un HR crudo de 13,81 (95%IC: 2,25–84,45, $p = 0,004$), KIT con un HR de 3,98 (95%IC: 1,20–13,18, $p = 0,024$), ERBB3 con un HR de 3,87 (95%IC: 1,06-14,04, $p = 0,04$), y MLH1 con un HR de 3,52 (95%IC: 0,95-13,09, $p = 0,06$) (Tabla 16). Además, se evaluó la supervivencia libre de progresión (PFS) en la primera y segunda recaída entre pacientes con y sin mutaciones en los genes PIK3C2B, ERBB3, KIT y MLH1 146. En la primera recaída, los pacientes que tenían las mutaciones en los genes

presentaban una SLP más baja (8,85 meses) que los que carecían de las mutaciones (27,55 meses).

Además, se comparó la SLP para la segunda recaída y los pacientes con mutaciones en estos cuatro genes tuvieron una SLP más baja (19,3 meses) que aquellos sin mutaciones (38,17 meses). Además, se observa que los pacientes que tienen mutaciones en el gen PIK3C2B tienen la menor supervivencia libre de progresión. Por tanto, presentar mutaciones en cualquiera de estos cuatro genes aumenta la probabilidad de recaída en los pacientes (Figura 29).

En el estudio encontramos que los genes PIK3C2B, ERBB3, KIT y MLH1 tenían tipos diferentes de mutaciones (Tabla 17), que podrían afectar la estructura y los dominios funcionales de las proteínas. Además, estas alteraciones podrían estar afectando diferentes interacciones y vías metabólicas, lo que podría ayudarnos a hipotetizar los mecanismos que utilizan las células cancerosas para proliferar y adquirir resistencia al tratamiento con temozolomida.

Después de evaluar el gen PIK3C2B, se encontró en un mismo paciente dos tipos de mutaciones, una amplificación conductora y un rearrreglo de significado desconocido. En otro paciente se encontró la mutación R458Q de significado desconocido. La proteína PIK3C2B participa en el proceso biosintético y de señalización de la fosfatidilinositol fosfatasa denominada PIK3C2B (fosfatidilinositol-4-fosfato 3-quinasa C2), que forma parte de una familia de enzimas capaces de fosforilar el grupo hidroxilo en la posición 3' del anillo de moléculas de inositol, llamados colectivamente fosfatidilinositol, que convierten el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) en fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), y luego fosforilan AKT, entre otros (453).

En cuanto al gen ERBB3, se encontraron dos mutaciones: R164K, que afecta al dominio (Rcp_L) y L1177I, que no afecta a ningún dominio funcional, pero sí a la estructura de la proteína. Este gen codifica un miembro de la familia de receptores de tirosina quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Esta proteína unida a la membrana tiene un dominio de unión a neuregulina pero no un dominio de quinasa activo. Por lo tanto, puede unirse a este ligando, pero no transmitir la señal a la célula a través de la fosforilación de proteínas. Sin embargo, forma heterodímeros con otros miembros de la familia del receptor de EGF que sí tienen actividad quinasa. La heterodimerización conduce a la activación de vías que conducen a la proliferación o diferenciación celular. La amplificación de este gen y/o la sobreexpresión de su proteína se han informado en numerosos cánceres, incluidos los tumores de próstata, vejiga y mama (368).

Al analizar al gen KIT, se encontraron una amplificación y una amplificación equívoca como mutaciones conductoras (Driver). Este gen codifica un receptor de tirosina quinasa e inicialmente se identificó como un homólogo del oncogén v-kit 179 viral del sarcoma felino y, a menudo, se lo conoce como protooncogén c-Kit. La forma canónica de esta proteína transmembrana glicosilada tiene una región extracelular N-terminal con cinco dominios similares a inmunoglobulina, una región transmembrana y una región intracelular con dominio tirosina quinasa en el extremo C-terminal. Tras la activación por su ligando de citoquina, el factor de células madre (SCF), esta proteína fosforila múltiples proteínas intracelulares que juegan un papel en la proliferación, diferenciación, migración y apoptosis de muchos tipos de células y, por lo tanto, juegan un papel importante en la hematopoyesis, mantenimiento de células madre, gametogénesis, melanogénesis y en el desarrollo, migración y función de los mastocitos. Esta proteína puede ser una proteína soluble o unida a la membrana (372).

En relación con el gen MLH1, se encontró la mutación conductora F261fs*7 y la mutación de significado desconocido L607. La proteína codificada por este gen puede heterodimerizarse con la endonucleasa de reparación de errores de emparejamiento PMS2 para formar MutL alfa 190, parte del sistema de reparación de errores de emparejamiento del ADN. Cuando MutL alfa, se une a MutS 191 beta y algunas proteínas accesorias, la subunidad PMS2 de MutL alfa introduce una única rotura de cadenas cerca de los desajustes de ADN, lo que proporciona un punto de entrada para la degradación de exonucleasas. Esta proteína también está implicada en la señalización de daños en el ADN y puede heterodimerizarse con la proteína de reparación de errores de emparejamiento de ADN MLH3 para formar MutL gamma, que está implicada en la meiosis (454,455).

De acuerdo con las funciones biológicas anteriores, se postulan fuera de la MGMT, dos posibles mecanismos de resistencia a temozolomida, en los que podrían estar implicados estos cuatro genes. Con respecto al primer mecanismo de resistencia, el receptor 3 del factor de crecimiento humano catalíticamente inactivo (ERBB3) solo puede servir como socio activador del dominio quinasa en un heterodímero en asociación con ERBB2 (Her2) (208,368,370,456). Su dominio de cola terminal carboxilo-201 transactivado posteriormente se une al dominio SH2 de las tres subunidades reguladoras PI3K (457). El protooncogén KIT transcribe el receptor homólogo del sarcoma viral felino 203 v-kit, también llamado CD117 (c-Kit), que al unirse al ligando fisiológico produce una dimerización que conduce a la transfosforilación.

Esto, a su vez, reorienta la membrana intracelular del dominio, liberándola de la conformación autoinhibitoria que adquiere en estado inactivo, y facilitando su función catalítica (363). Al igual que el receptor anterior, algunos de estos sitios de fosforilación en el dominio de la membrana interna de c-Kit se unen con los dominios SH2, formando sitios de acoplamiento para la señalización y activación de la vía (PI3K, Akt, TSC1/2, mTOR1/ 2 y factor de transcripción) (458). En condiciones fisiológicas, la estimulación del factor de crecimiento, en este caso, neuregulina para ERBB3 y factor de células madre para c-kit, fosforila quinasas específicas de la enzima que componen PI3K a través de la asociación secuencial con moléculas adaptadoras (cascada GRB2-SOS-RAS); la PI3K activada fosforila y convierte la PIP2 en PIP3, ubicada en la superficie media de la membrana plasmática. La AKT activada fosforila e inactiva el complejo TSC1/2. Esto activa mTORC1 al inhibir la supresión de mTORC1 mediada por el homólogo Ras de la proteína de unión a GTP enriquecida en el cerebro (RHEB) para estimular la proliferación y supervivencia celular (408). En la vía RTK-PI3K-mTOR2, este último se une a los ribosomas y activa las quinasas de la subfamilia AGC (quinasas Akt inducidas por glucocorticoides/suero y PKC α), lo que estimula la migración celular (459).

En relación con las enzimas quinasas, que forman parte de la familia PI3K, y a partir de las cuales se sintetizan fosfolípidos de inositol (PI) fosforilados, concentrados en la superficie citosólica de las membranas, especialmente en el retículo endoplásmico, fuera de tener una función estructural, tienen también funciones importantes en la señalización celular (393,460). El dieciocho por ciento de los glioblastomas tienen una mutación somática de los genes PIK3CA y PIK3R1, que codifican la subunidad p85 y la subunidad p110 de PI3K, respectivamente (389). La mayoría de las mutaciones de PIK3CA y PIK3R1 se encuentran con frecuencia en el dominio requerido para la interacción de la subunidad p85 con la subunidad p110 (388). Se pierde la inhibición de la actividad de la subunidad p110 de por parte de la subunidad p85, y los mutantes de PI3K se vuelven constitutivamente activos, lo que da como resultado una actividad de AKT sostenida (399).

PIK3C2B es una enzima catalítica de la familia PI3K, cuyas funciones son fosforilar el grupo hidroxilo en la posición 3' del anillo de inositol en la membrana plasmática y generar importantes segundos mensajeros como PIP2 y PIP3 (411). Se ha descrito la amplificación de PIK3C2B [45], asociada a MDM4 por la

amplificación 1q32.1, y correspondiente al 7,7% de las amplificaciones detectadas en glioblastomas (399,461). PIK3C2B tiene una doble función, ya que puede estimular o reprimir, según se programe (393). Está implicado en la activación de AKT en neuronas (397), en la represión de mTORC1 (402), en la transición epitelio-mesenquimatosa (402), en la migración de células cancerosas (460), en pro invasión motora (403), y en la resistencia al cisplatino (462), docetaxel (406) y erlotinib en pacientes que tienen la mutación EGFR (407). En relación con el papel de esta mutación en la posible resistencia a la temozolomida, posiblemente sería estimulando el factor de transcripción NFkB y, a su vez, MDR1 (185).

Con respecto al segundo mecanismo de resistencia, se han informado alteraciones en genes que forman parte del sistema de reparación de errores de emparejamiento de ADN en glioblastomas recurrentes después del uso de temozolomida (463). El análisis del Cancer Genome Atlas (TCGA) reveló un fenotipo hipermutador, con mutaciones en al menos uno de los genes MMR (MLH1, MSH2, MSH6 o PMS2), lo que sugiere un escape de la metilación de MGMT o la selección de MMR clones mutados para MMR (448).

Felsberg et al. informaron cambios en la metilación del promotor y la expresión de los genes MGMT, MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2 después de la recaída en 80 pacientes con glioblastomas, encontrando que solo cuatro pacientes (6,25 %) tenían una pérdida o disminución de la metilación del promotor MGMT en la recurrencia, y aunque ninguno de los 4 genes que forman parte de MMR tenía hipermetilación del promotor, sí tenían mutaciones, lo que fue confirmado por IHC (464,465). Las roturas de doble cadena de ADN por temozolomida activan la reparación homóloga y los sistemas de empalme de extremos no homólogos que, a través de las vías de la ataxia telangiectasia (ATM)-punto de control quinasa 2 (CHK2), conducen a la reparación del daño de p53 causado por temozolomida o desencadenar la apoptosis (464).

Otros mecanismos de resistencia a la temozolomida consisten en el correcto funcionamiento o sobreactivación de algunos de los componentes del BER, como la APGN, que repararía la metilación en N7 de guanina y N3 de adenina (309). Se puede desarrollar resistencia a la temozolomida debido a la sobreactivación de MDM2, que aumenta el inhibidor de la proteína de apoptosis ligado a X (XIAP). Este regulador clave de la señalización de muerte celular programada tanto intrínseca como extrínseca funciona suprimiendo la activación de las caspasas 3, 7 y 9, desencadenando su degradación mediada por la ubiquitinación o por el funcionamiento inadecuado de p53; por lo tanto, es incapaz de activar la familia Bcl2 y la activación del receptor DR5 (466).

9 LIMITACIONES

Desde lo financiero, se encontró que debido a los altos costos de la prueba genética del laboratorio Roche Foundation Medicine, no se pudo realizar más pruebas (3.500 USD por prueba aprox), teniendo presente que el laboratorio en mención realizó una donación de 10 pruebas y EPS Sura autorizó las otras 21, sumado a esto los trámites administrativos presentaban retrasos desde que se solicitaba la prueba hasta que se obtenía el reporte final independiente de la prueba realizada.

El tiempo de seguimiento de los pacientes hasta el evento (segunda recaída), varían entre cada uno de los participantes, lo cual exigía un tiempo mayor si se quisiera tomar datos prospectivos.

10 CONCLUSIONES

La presente investigación tuvo como objetivo relacionar mutaciones en los genes *PIK3C2B*, *ERBB3*, *KIT* y *MLH1* con mecanismos de resistencia a temozolomida en pacientes con gliomas de alto grado. Con este estudio permitió descubrir nuevos mecanismos de resistencia a la temozolomida encaminados a proporcionar un tratamiento adecuado a los pacientes que prolongue su vida. Este trabajo aporta evidencia a la comunidad científica sobre la adquisición progresiva de mutaciones en diferentes genes de pacientes con gliomas de alto grado que se relacionan con mecanismos de resistencia a fármacos y progresión acelerada de la enfermedad. Adicionalmente, en el futuro se podrán proponer nuevas dianas terapéuticas para la generación de fármacos que puedan controlar o curar este tipo de cáncer cerebral.

El tratamiento para pacientes con gliomas de alto grado incluye radioterapia y temozolomida. Sin embargo, algunos pacientes no responden a la temozolomida porque tienen un mecanismo de reversión de la metilación a través de la enzima *MGMT*. Este biomarcador se ha tratado de utilizar como factor pronóstico en pacientes que reciben tratamiento con temozolomida. Sin embargo, no todos los pacientes responden de la misma manera, lo que sugiere la existencia de otros genes implicados en la resistencia a la temozolomida.

Se reclutó un grupo de 31 pacientes con gliomas de alto grado y se caracterizó clínica, patrón de imagen y patológicamente. Se realizó la secuenciación de 324 genes relacionados con diferentes tipos de cáncer para detectar 370 diferentes tipos de mutaciones, lo que permitió reevaluar el diagnóstico histológico en 4 pacientes: 2 cambian de GB a $A^{MUT-IDH/G3-4}$; 1 que cambia de AA a $O^{MUT-IDH,1p/19q/G3}$ y el 1 de OAA que cambia a $A^{MUT-IDH/G3-4}$. Posteriormente, se realizó un análisis estadístico para determinar los genes mutados que más se relacionaban con la resistencia al tratamiento.

Los genes relacionados con la segunda recaída de pacientes con glioma de alto grado tras el uso de temozolomida según protocolo Stupp y dosis metronómica fueron *PIK3C2B*, *KIT*, *ERBB3* y *MLH1*. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, sugerimos que las mutaciones en algunos de estos cuatro genes, sumado al hallazgo de la no metilación del gen promotor que codifica para la proteína *MGMT* podrían estar relacionadas con una mala evolución clínica de los pacientes con gliomas de alto grado y una posible resistencia al tratamiento con temozolomida.

En relación con las mutaciones de *PIK3C2 β* , *ERBB3* y *KIT* encontradas en los pacientes con HGG y relacionadas con la disfunción de la vía PAM. La activación de *ERBB3* o *c-kit*, activan *PIK3-AKT-mTOR* y a su vez, el factor de transcripción *NF κ B*, lo cual estimula la transcripción del gen de resistencia “multidrogas” *MDR1* (Figura 22). La activación de esta vía contribuye a su vez a la resistencia a la TMZ al estimular los mecanismos de reparación de roturas de doble cadena (DSB), tipo recombinación homóloga (HR) y de unión de extremos no homólogos (NEHJ) en las células tumorales.

Con respecto a la mutación de *MLH1* en los 31 pacientes analizados, hay que recordar que a pH fisiológico, la TMZ se convierte en su compuesto activo metildiazonium, que induce la metilación del ADN en la posición O⁶ de la guanina o en la posición N⁷ de la guanina y N³ de la adenina, lo que da como resultado la activación de dos mecanismos de reparación diferentes: mientras que la metilación en la posición O⁶ de la guanina genera un emparejamiento incorrecto de bases con la timina en el primer ciclo de replicación (O⁶G-T) e induce ciclos fútiles de reparación de desajustes (MMR) lo que permite se acumulen cadenas con O⁶G llevando a apoptosis; la metilación de la posición N⁷ de la guanina o la posición N³ de la adenina activan la escisión de la base mecanismo de reparación (BER) que repara el daño causado por la TMZ.

El sistema BER es iniciado por la alquilpurina-ADN-N-glicosilasa (APNG) y está regulado por la poli ADP-ribosa polimerasa (PARP-1), que detecta el daño, recluta proteínas reparadoras del ADN y conduce a la muerte celular por apoptosis en las células que expresan p53 de tipo salvaje, mientras que mata las células por necrosis en las células que carecen de p53 funcional, es por ello por lo que la TMZ es eficaz incluso en ausencia de un sistema de reparación activo.

Los cuatro genes que se relacionaron con la segunda recaída con el uso de la temozolamida, hacen parte de las cascadas descritas en el desarrollo de diferentes neoplasias, pero solo *MLH1* se había relacionado directamente con la resistencia a la temozolamida.

11 CONFLICTO DE INTERÉS

Declaro que esta investigación no presenta conflicto de interés.

12 RECOMENDACIONES

Es necesario establecer un mecanismo de reporte de los casos nuevos, con el ánimo de tener datos actualizados de la población afectada en Colombia.

Se debe complementar el informe de patología basado en H-E e IHQ con una plataforma que incluya *IDH*, *ATRX*, *TP53*, *CDKN2A/B*, promotor de *TERT*, *CIC*, *FUBP1*, *NOTCH1*, *EGFR* y a su vez buscar la codeleción 1p/19q, trisomía 7 y monosomía 10, lo cual permitirá clasificar los HGG adecuadamente, basado en los criterios de la OMS-5^{ed}.

Con fines pronósticos se debe complementar la búsqueda de la metilación del promotor de *MGMT* con *PIK3C2 β* y/o *ERBB3* y/o *KIT*, y/o *MLH1*. Se requieren más estudios tratando de validar el papel predictivo de estos últimos genes.

13 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ostrom QT, Cioffi G, Waite K, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2014–2018. *Neuro-Oncol.* 2021 Oct 5;23(Supplement_3):iii1–105.
2. Iuchi T, Sugiyama T, Ohira M, Kageyama H, Yokoi S, Sakaida T, et al. Clinical significance of the 2016 WHO classification in Japanese patients with gliomas. *Brain Tumor Pathol.* 2018 Apr;35(2):71–80.
3. Gómez Vega JC, Ocampo Navia MI, De Vries E, Feo Lee O. Sobrevida de los tumores cerebrales primarios en Colombia. *Univ Médica [Internet].* 2020 May 7 [cited 2022 Jun 12];61(3). Available from: <https://revistas.javeriana.edu.co/index.php/vnimedica/article/view/27985>
4. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-Oncol.* 2021 Aug 2;23(8):1231–51.
5. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005 Mar 10;352(10):987–96.
6. Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res.* 1999 Feb 15;59(4):793–7.
7. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, et al. *MGMT* Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005 Mar 10;352(10):997–1003.
8. Polivka J, Polivka J, Repik T, Rohan V, Hes O, Topolcan O. Co-deletion of 1p/19q as Prognostic and Predictive Biomarker for Patients in West Bohemia with Anaplastic Oligodendroglioma. *Anticancer Res.* 2016 Jan;36(1):471–6.
9. Berzero G, Di Stefano AL, Ronchi S, Bielle F, Villa C, Guillerme E, et al. *IDH* -wildtype lower-grade diffuse gliomas: the importance of histological grade and molecular assessment for prognostic stratification. *Neuro-Oncol.* 2021 Jun 1;23(6):955–66.
10. Yang Z, Ling F, Ruan S, Hu J, Tang M, Sun X, et al. Clinical and Prognostic Implications of 1p/19q, IDH, BRAF, *MGMT* Promoter, and TERT Promoter Alterations, and Expression of Ki-67 and p53 in Human Gliomas. *Cancer Manag*

Res. 2021 Nov;Volume 13:8755–65.

11. Choi J, Kim SH, Ahn SS, Choi HJ, Yoon HI, Cho JH, et al. Extent of resection and molecular pathologic subtype are potent prognostic factors of adult WHO grade II glioma. *Sci Rep.* 2020 Feb 7;10(1):2086.
12. Zhang J, Stevens MFG, Bradshaw TD. Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Curr Mol Pharmacol.* 2012 Jan;5(1):102–14.
13. Lakomy R, Kazda T, Selingerova I, Poprach A, Pospisil P, Belanova R, et al. Real-World Evidence in Glioblastoma: Stupp's Regimen After a Decade. *Front Oncol.* 2020 Jul 3;10: 840.
14. Low JT, Ostrom QT, Cioffi G, Neff C, Waite KA, Kruchko C, et al. Primary brain and other central nervous system tumors in the United States (2014-2018): A summary of the CBTRUS statistical report for clinicians. *Neuro-Oncol Pract.* 2022 May 13;9(3):165–82.
15. Lakomy R, Kazda T, Selingerova I, Poprach A, Pospisil P, Belanova R, et al. Real-World Evidence in Glioblastoma: Stupp's Regimen After a Decade. *Front Oncol.* 2020 Jul 3;10:840.
16. Ortiz L, Cardona A, Fadul C. The use of radiotherapy plus TMZ administered concomitantly with and after radiotherapy (Stupp platform; SP) for HGG was shown to improve median and 5-year survival. To compare these results with routine clinical practice a bidirectional registry was established by RedLANO. *J Clin Oncol.* 2011;29(suppl;abstr 2092).
17. Gnoni A, Silvestris N, Licchetta A, Santini D, Scartozzi M, Ria R, et al. Metronomic chemotherapy from rationale to clinical studies: A dream or reality? *Crit Rev Oncol Hematol.* 2015 Jul;95(1):46–61.
18. Barrera L, Ortiz L, Grisales H, Rojas M, Camargo M. Flow cytometry in peripheral blood reticulocytes as marker of chromosome instability in high-grade gliomas patients. *Biomedica.* 2018;38(4):Citacion provisional.
19. Barrera Arenas LM, Restrepo Atehortúa J, Ortíz LD, Camargo Guerrero M. Búsqueda de nuevos biomarcadores genéticos en gliomas de alto grado. *Actual Biológicas.* 2020 Feb 26;41(111):01–9.
20. Felipe Cardona A, Balana C, Torres D, Becerra H, Dario Ortiz L, E. Fadul C. Stem Cells in Brain Tumorigenesis and their Impact on Therapy. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2011 Dec 1;6(4):339–49.

21. GLIOBLASTOMA RESISTANCE TO CHEMOTHERAPY: molecular mechanisms and. S.I.: ELSEVIER ACADEMIC PRESS; 2021.
22. Zolotovskaia MA, Kovalenko MA, Tkachev VS, Simonov AM, Sorokin MI, Kim E, et al. Next-Generation Grade and Survival Expression Biomarkers of Human Gliomas Based on Algorithmically Reconstructed Molecular Pathways. *Int J Mol Sci*. 2022 Jun 30;23(13):7330.
23. Cardona AF, Rojas L, Wills B, Behaine J, Jiménez E, Hakim F, et al. Genotyping low-grade gliomas among Hispanics. *Neuro-Oncol Pract*. 2016 Sep 1;3(3):164–72.
24. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-Oncol*. 2021 Aug 2;23(8):1231–51.
25. Romero-Rojas AE, Diaz-Perez JA, Chinchilla-Olaya SI, Amaro D, Lozano-Castillo A, Restrepo-Escobar LI. Histopathological and immunohistochemical profile in anaplastic gangliogliomas. *Neurocirugía*. 2013 Nov;24(6):237–43.
26. Popova SN, Bergqvist M, Dimberg A, Edqvist PH, Ekman S, Hesselager G, et al. Subtyping of gliomas of various WHO grades by the application of immunohistochemistry. *Histopathology*. 2014 Feb;64(3):365–79.
27. Takeda M, Takahama T, Sakai K, Shimizu S, Watanabe S, Kawakami H, et al. Clinical Application of the FoundationOne CDx Assay to Therapeutic Decision-Making for Patients with Advanced Solid Tumors. *The Oncologist*. 2021 Apr 1;26(4):e588–96.
28. Grimm SA, Chamberlain MC. Anaplastic astrocytoma. *CNS Oncol*. 2016 Jul;5(3):145–57.
29. Cao L, Rong P, Zhu G, Xu A, Chen S. Clinical Characteristics and Overall Survival Prognostic Nomogram for Oligodendroglioma: A Surveillance, Epidemiology, and End Results Population-Based Analysis. *World Neurosurg*. 2021 Jul;151:e810–20.
30. Mattiuzzi C, Lippi G. Current Cancer Epidemiology: *J Epidemiol Glob Health*. 2019;9(4):217.
31. Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Rouse C, Chen Y, Dowling J, et al. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011. *Neuro-Oncol*. 2014 Oct;16 Suppl 4:iv1-63.

32. Ostrom QT, Price M, Neff C, Cioffi G, Waite KA, Kruchko C, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2015–2019. *Neuro-Oncol.* 2022 Oct 5;24(Supplement_5):v1–95.
33. Armstrong TS, Bishof AM, Brown PD, Klein M, Taphoorn MJB, Theodore-Oklota C. Determining priority signs and symptoms for use as clinical outcomes assessments in trials including patients with malignant gliomas: Panel 1 Report. *Neuro-Oncol.* 2016 Mar;18(suppl 2):ii1–12.
34. Toledo M, Sarria-Estrada S, Quintana M, Maldonado X, Martinez-Ricarte F, Rodon J, et al. Prognostic implications of epilepsy in glioblastomas. *Clin Neurol Neurosurg.* 2015 Dec;139:166–71.
35. Kerkhof M, Benit C, Duran-Pena A, Vecht CJ. Seizures in oligodendroglial tumors. *CNS Oncol.* 2015 Oct;4(5):347–56.
36. Zahir ST, Vakili M, Navabii H, Rahmani K. Clinicopathological findings and five year survival rates for patients with central nervous system tumors in Yazd, Iran. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP.* 2014;15(23):10319–23.
37. Hilton-Jones D, Ponsford JR, Graham N. Transient visual obscurations, without papilloedema. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1982 Sep 1;45(9):832–4.
38. Gotecha S. Neuro-ophthalmic manifestations of intracranial space occupying lesions in adults. *Beyoglu Eye J [Internet].* 2022 [cited 2023 Jan 24]; Available from: <https://beyoglueye.com/jvi.aspx?un=BEJ-50469&volume=>
39. Takubo H, Satoh S, Mori H, Tsukahara M, Suda K, Imai H, et al. [A 57-year-old woman with gait disturbance, headache, character change, convulsion, and coma]. *No To Shinkei.* 1995 Jul;47(7):699–708.
40. Castañeda CA, Casavilca S, Orrego E, García-Corrochano P, Deza P, Heinike H, et al. [Glioblastoma: Molecular analysis and its clinical implications]. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2015 Jun;32(2):316–25.
41. Salazar OM, VanHoutte P, Plassche WM, Keller BE. The role of computed tomography in the diagnosis and management of brain tumors. *J Comput Tomogr.* 1981 Aug;5(3):256–67.
42. Jia ZZ, Shi W, Shi JL, Shen DD, Gu HM, Zhou XJ. Comparison between perfusion computed tomography and dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging in assessing glioblastoma microvasculature. *Eur J Radiol.* 2017 Feb;87:120–4.
43. Alkanhal H, Das K, Poptani H. Diffusion- and Perfusion-Weighted Magnetic

Resonance Imaging Methods in Nonenhancing Gliomas. *World Neurosurg.* 2020 Sep;141:123–30.

44. Pope WB, Brandal G. Conventional and advanced magnetic resonance imaging in patients with high-grade glioma. *Q J Nucl Med Mol Imaging* [Internet]. 2018 Sep [cited 2023 Jan 25];62(3). Available from: <https://www.minervamedica.it/index2.php?show=R39Y2018N03A0239>

45. Alifieris C, Trafalis DT. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacol Ther.* 2015 Aug;152:63–82.

46. Marks JE, Baglan RJ, Prasad SC, Blank WF. Cerebral radionecrosis: incidence and risk in relation to dose, time, fractionation and volume. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1981 Feb;7(2):243–52.

47. Jensen P, Feng L, Law I, Svarer C, Knudsen GM, Mikkelsen JD, et al. TSPO Imaging in Glioblastoma Multiforme: A Direct Comparison Between ¹²³I-CLINDE SPECT, ¹⁸F-FET PET, and Gadolinium-Enhanced MR Imaging. *J Nucl Med.* 2015 Sep 1;56(9):1386–90.

48. Roberts DW, Valdés PA, Harris BT, Hartov A, Fan X, Ji S, et al. Glioblastoma Multiforme Treatment with Clinical Trials for Surgical Resection (Aminolevulinic Acid). *Neurosurg Clin N Am.* 2012 Jul;23(3):371–7.

49. Shah AH, Graham R, Bregy A, Thambuswamy M, Komotar RJ. Recognizing and Correcting Failures in Glioblastoma Treatment. *Cancer Invest.* 2014 Jul 3;32(6):299–302.

50. Lacroix M, Abi-Said D, Fourney DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, et al. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg.* 2001 Aug;95(2):190–8.

51. Mariniello G, Peca C, De Caro M, Giamundo A, Donzelli R, Maiuri F. Glioblastoma in the Elderly: The Impact of Advanced Age on Treatment and Survival. *J Neurol Surg Part Cent Eur Neurosurg.* 2014 Jan 4;75(04):276–81.

52. Wańkiewicz P, Nowacki P. [GLIOBLASTOMA MULTIFORME--THE PROGRESS OF KNOWLEDGE ON THE PATHOGENESIS OF CANCER]. *Ann Acad Med Stetin.* 2014;60(2):40–3.

53. Yung WKA, Prados MD, Yaya-Tur R, Rosenfeld SS, Brada M, Friedman HS, et al. Multicenter Phase II Trial of Temozolomide in Patients With Anaplastic Astrocytoma or Anaplastic Oligoastrocytoma at First Relapse. *J Clin Oncol.* 1999 Sep;17(9):2762–2762.

54. Wirsching HG, Galanis E, Weller M. Glioblastoma. In: Handbook of Clinical Neurology [Internet]. Elsevier; 2016 [cited 2023 Feb 25]. p. 381–97. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128029978000232>
55. Navarrete M. The Cajal school and the physiological role of astrocytes: a way of thinking. *Front Neuroanat* [Internet]. 2014 [cited 2023 Feb 24];8. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnana.2014.00033/abstract>
56. Kumthekar P, Raizer J, Singh S. Low-Grade Glioma. In: Raizer J, Parsa A, editors. *Current Understanding and Treatment of Gliomas* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2015 [cited 2023 Feb 22]. p. 75–87. (Cancer Treatment and Research; vol. 163). Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-12048-5_5
57. DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA, editors. *Cancer: principles & practice of oncology. Primer of the molecular biology of cancer. Third edition.* Philadelphia: Wolters Kluwer; 2021.
58. Cao VT, Jung TY, Jung S, Jin SG, Moon KS, Kim IY, et al. THE CORRELATION AND PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF MGMT PROMOTER METHYLATION AND MGMT PROTEIN IN GLIOBLASTOMAS. *Neurosurgery*. 2009 Nov;65(5):866–75.
59. Sharaf R, Pavlick DC, Frampton GM, Cooper M, Jenkins J, Danziger N, et al. FoundationOne CDx testing accurately determines whole arm 1p19q codeletion status in gliomas. *Neuro-Oncol Adv*. 2021 Jan 1;3(1):vdab017.
60. Capper D, Reifenberger G, French PJ, Schweizer L, Weller M, Touat M, et al. EANO guideline on rational molecular testing of gliomas, glioneuronal and neuronal tumors in adults for targeted therapy selection. *Neuro-Oncol*. 2023 Jan 12;noad008.
61. Gzell C, Back M, Wheeler H, Bailey D, Foote M. Radiotherapy in Glioblastoma: the Past, the Present and the Future. *Clin Oncol*. 2017 Jan;29(1):15–25.
62. Walker MD, Alexander E, Hunt WE, MacCarty CS, Mahaley MS, Mealey J, et al. Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas: A cooperative clinical trial. *J Neurosurg*. 1978 Sep;49(3):333–43.
63. Barbarite E, Sick JT, Berchmans E, Bregy A, Shah AH, Elsayyad N, et al. The role of brachytherapy in the treatment of glioblastoma multiforme. *Neurosurg Rev*. 2017 Apr;40(2):195–211.
64. Dhermain F. Radiotherapy of high-grade gliomas: current standards and

new concepts, innovations in imaging and radiotherapy, and new therapeutic approaches. *Chin J Cancer*. 2014 Jan 5;33(1):16–24.

65. Niyazi M, Schwarz SB, Suchorska B, Belka C. Radiotherapy with and without temozolomide in elderly patients with glioblastoma. *Strahlenther Onkol*. 2012 Feb;188(2):154–9.

66. Vikram B, Coleman CN, Deye JA. Current status and future potential of advanced technologies in radiation oncology. Part 2. State of the science by anatomic site. *Oncol Williston Park N*. 2009 Apr 15;23(4):380–5.

67. Marks JE, Baglan RJ, Prasad SC, Blank WF. Cerebral radionecrosis: incidence and risk in relation to dose, time, fractionation and volume. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1981 Feb;7(2):243–52.

68. Kortmann RD, Jeremic B, Weller M, Plasswilm L, Bamberg M. Radiochemotherapy of Malignant Glioma in Adults: Clinical Experiences. *Strahlenther Onkol*. 2003 Apr;179(4):219–32.

69. Carrasco-Garcia E, Sampron N, Aldaz P, Arrizabalaga O, Villanua J, Barrena C, et al. Therapeutic strategies targeting glioblastoma stem cells. *Recent Patents Anticancer Drug Discov*. 2013 Sep;8(3):216–27.

70. Westermark B. Glioblastoma--a moving target. *Ups J Med Sci*. 2012 May;117(2):251–6.

71. Newton HB. Handbook of brain tumor chemotherapy, molecular therapeutics, and immunotherapy. 2nd edition. Waltham, MA: Elsevier; 2018.

72. Stewart LA. Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. *Lancet Lond Engl*. 2002 Mar 23;359(9311):1011–8.

73. Ralhan R, Kaur J. Alkylating agents and cancer therapy. *Expert Opin Ther Pat*. 2007 Sep;17(9):1061–75.

74. Westphal M, Hilt DC, Bortey E, Delavault P, Olivares R, Warnke PC, et al. A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro-Oncol*. 2003 Apr 1;5(2):79–88.

75. Tonder M, Eisele G, Weiss T, Hofer S, Seystahl K, Valavanis A, et al. Addition of lomustine for bevacizumab-refractory recurrent glioblastoma. *Acta*

Oncol. 2014 Oct;53(10):1436–40.

76. Olson JJ, Nayak L, Ormond DR, Wen PY, Kalkanis SN. The role of cytotoxic chemotherapy in the management of progressive glioblastoma: A systematic review and evidence-based clinical practice guideline. *J Neurooncol.* 2014 Jul;118(3):501–55.

77. Meikle SR, Matthews JC, Brock CS, Wells P, Harte RJA, Cunningham VJ, et al. Pharmacokinetic assessment of novel anti-cancer drugs using spectral analysis and positron emission tomography: A feasibility study. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1998 Jul;42(3):183–93.

78. Luck K, Kim DK, Lambourne L, Spirohn K, Begg BE, Bian W, et al. A reference map of the human binary protein interactome. *Nature.* 2020 Apr 16;580(7803):402–8.

79. Temozolomida en el glioma maligno. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2017 Sep 9]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bd/digital.ces.edu.co/2443/pubmed/20856849>

80. Kast RE, Ramiro S, Lladó S, Toro S, Coveñas R, Muñoz M. Antitumor action of temozolomide, ritonavir and aprepitant against human glioma cells. *J Neurooncol.* 2016 Feb;126(3):425–31.

81. Barciszewska AM, Gurda D, Głodowicz P, Nowak S, Naskręt-Barciszewska MZ. A New Epigenetic Mechanism of Temozolomide Action in Glioma Cells. *PLoS One.* 2015;10(8):e0136669.

82. Koukourakis G, Kouloulis V, Zacharias G, Papadimitriou C, Pantelakos P, Maravelis G, et al. Temozolomide with Radiation Therapy in High Grade Brain Gliomas: Pharmaceuticals Considerations and Efficacy;A Review Article. *Molecules.* 2009 Apr 16;14(4):1561–77.

83. Shen W, Hu JA, Zheng JS. Mechanism of temozolomide-induced antitumour effects on glioma cells. *J Int Med Res.* 2014 Feb;42(1):164–72.

84. Bei R, Marzocchella L, Turriziani M. The use of temozolomide for the treatment of malignant tumors: clinical evidence and molecular mechanisms of action. *Recent Patents Anticancer Drug Discov.* 2010 Nov;5(3):172–87.

85. Wesolowski JR, Rajdev P, Mukherji SK. Temozolomide (Temodar). *AJNR Am J Neuroradiol.* 2010 Sep;31(8):1383–4.

86. Messali A, Villacorta R, Hay JW. A review of the economic burden of glioblastoma and the cost effectiveness of pharmacologic treatments.

Pharmacoeconomics. 2014 Dec;32(12):1201–12.

87. Johnson DR, O'Neill BP. Glioblastoma survival in the United States before and during the temozolomide era. *J Neurooncol*. 2012 Apr;107(2):359–64.

88. Ortiz LD, Syro LV, Scheithauer BW, Rotondo F, Uribe H, Fadul CE, et al. Temozolomide in aggressive pituitary adenomas and carcinomas. *Clinics*. 2012 Apr;67:119–23.

89. Syro LV, Rotondo F, Ortiz LD, Kovacs K. 65 YEARS OF THE DOUBLE HELIX: Treatment of pituitary tumors with temozolomide: an update. *Endocr Relat Cancer*. 2018 Aug;25(8):T159–69.

90. McCormack A, Dekkers OM, Petersenn S, Popovic V, Trouillas J, Raverot G, et al. Treatment of aggressive pituitary tumours and carcinomas: results of a European Society of Endocrinology (ESE) survey 2016. *Eur J Endocrinol*. 2018 Mar;178(3):265–76.

91. Syro LV, Rotondo F, Serna CA, Ortiz LD, Kovacs K. Pathology of GH-producing pituitary adenomas and GH cell hyperplasia of the pituitary. *Pituitary*. 2017 Feb;20(1):84–92.

92. Syro LV, Scheithauer BW, Kovacs K, Toledo RA, Londoño FJ, Ortiz LD, et al. Pituitary tumors in patients with MEN1 syndrome. *Clinics*. 2012 Apr;67:43–8.

93. Syro LV, Uribe H, Penagos LC, Ortiz LD, Fadul CE, Horvath E, et al. Antitumour effects of temozolomide in a man with a large, invasive prolactin-producing pituitary neoplasm. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2006 Oct;65(4):552–3.

94. Kovacs K, Horvath E, Syro LV, Uribe H, Penagos LC, Ortiz LD, et al. Temozolomide therapy in a man with an aggressive prolactin-secreting pituitary neoplasm: morphological findings. *Hum Pathol*. 2007 Jan;38(1):185–9.

95. Moshkin O, Syro L, Scheithauer B, Ortiz L, Fadul C, Uribe H, et al. Aggressive silent corticotroph adenoma progressing to pituitary carcinoma. The role of temozolomide therapy. *HORMONES*. 2011 Apr 15;10(2):162–7.

96. Syro L, Scheithauer B, Ortiz L, Fadul C, Horvath E, Rotondo F, et al. Effect of Temozolomide in a patient with recurring oncocytic gonadotrophic pituitary adenoma. *HORMONES*. 2009 Oct 15;8(4):303–6.

97. Ersen A, Syro LV, Penagos LC, Uribe H, Scheithauer BW, Ortiz LD, et al. Non-uniform Response to Temozolomide Therapy in a Pituitary Gonadotroph Adenoma. *Can J Neurol Sci J Can Sci Neurol*. 2012 Sep;39(5):683–5.

98. Syro LV, Rotondo F, Camargo M, Ortiz LD, Serna CA, Kovacs K.

Temozolomide and Pituitary Tumors: Current Understanding, Unresolved Issues, and Future Directions. *Front Endocrinol*. 2018 Jun 15;9:318.

99. Syro LV, Ortiz LD, Scheithauer BW, Lloyd R, Lau Q, Gonzalez R, et al. Treatment of pituitary neoplasms with temozolomide: A review. *Cancer*. 2011 Feb 1;117(3):454–62.

100. Kovacs K, Scheithauer BW, Lombardero M, McLendon RE, Syro LV, Uribe H, et al. MGMT immunoexpression predicts responsiveness of pituitary tumors to temozolomide therapy. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2008 Feb;115(2):261–2.

101. Stupp R, Dietrich PY, Kraljevic SO, Pica A, Maillard I, Maeder P, et al. Promising Survival for Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma Multiforme Treated With Concomitant Radiation Plus Temozolomide Followed by Adjuvant Temozolomide. *J Clin Oncol*. 2002 Mar;20(5):1375–82.

102. 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 May;10(5):459–66.

103. Yang LJ, Zhou CF, Lin ZX. Temozolomide and Radiotherapy for Newly Diagnosed Glioblastoma Multiforme: A Systematic Review. *Cancer Invest*. 2014 Feb;32(2):31–6.

104. Villa S, Balana C, Comas S. Radiation and concomitant chemotherapy for patients with glioblastoma multiforme. *Chin J Cancer*. 2014 Jan 5;33(1):25–31.

105. Binabaj MM, Bahrami A, ShahidSales S, Joodi M, Joudi Mashhad M, Hassanian SM, et al. The prognostic value of MGMT promoter methylation in glioblastoma: A meta-analysis of clinical trials. *J Cell Physiol*. 2018 Jan;233(1):378–86.

106. Roldán Urgoiti GB, Singh AD, Easaw JC. Extended adjuvant temozolomide for treatment of newly diagnosed glioblastoma multiforme. *J Neurooncol*. 2012 May;108(1):173–7.

107. van den Bent MJ, Baumert B, Erridge SC, Vogelbaum MA, Nowak AK, Sanson M, et al. Interim results from the CATNON trial (EORTC study 26053-22054) of treatment with concurrent and adjuvant temozolomide for 1p/19q non-co-deleted anaplastic glioma: a phase 3, randomised, open-label intergroup study. *The Lancet*. 2017 Oct;390(10103):1645–53.

108. Macy R, Granados Jarque R, Meléndez Andreu E. Química orgánica

simplificada. Barcelona: Reverté; 2005.

109. Brandes AA, Franceschi E, Paccapelo A, Tallini G, De Biase D, Ghimenton C, et al. Role of *MGMT* Methylation Status at Time of Diagnosis and Recurrence for Patients with Glioblastoma: Clinical Implications. *The Oncologist*. 2017 Apr;22(4):432–7.

110. Tini P, Pastina P, Nardone V, Sebaste L, Toscano M, Miracco C, et al. The combined EGFR protein expression analysis refines the prognostic value of the *MGMT* promoter methylation status in glioblastoma. *Clin Neurol Neurosurg*. 2016 Oct;149:15–21.

111. Rapkins RW, Wang F, Nguyen HN, Cloughesy TF, Lai A, Ha W, et al. The *MGMT* promoter SNP rs16906252 is a risk factor for *MGMT* methylation in glioblastoma and is predictive of response to temozolomide. *Neuro-Oncol*. 2015 Dec;17(12):1589–98.

112. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, et al. *MGMT* Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005 Mar 10;352(10):997–1003.

113. Theeler BJ, Gilbert MR. Advances in the treatment of newly diagnosed glioblastoma. *BMC Med* [Internet]. 2015 Dec [cited 2018 May 27];13(1). Available from: <http://www.biomedcentral.com/1741-7015/13/293>

114. Andersen KK, Bernstein DT. Some chemical constituents of the scent of the striped skunk (*Mephitis mephitis*). *J Chem Ecol*. 1976;1(4):493–9.

115. Kostka T, Empl MT, Seiwert N, Geisen SM, Hoffmann P, Adam J, et al. Repair of *O* 6-carboxymethylguanine adducts by *O* 6-methylguanine-DNA methyltransferase in human colon epithelial cells. *Carcinogenesis*. 2021 Aug 19;42(8):1110–8.

116. Quillien V, Lavenu A, Ducray F, Joly MO, Chinot O, Fina F, et al. Validation of the high-performance of pyrosequencing for clinical *MGMT* testing on a cohort of glioblastoma patients from a prospective dedicated multicentric trial. *Oncotarget* [Internet]. 2016 Sep 20 [cited 2018 Sep 22];7(38). Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/11322>

117. Da Ros M, De Gregorio V, Iorio A, Giunti L, Guidi M, de Martino M, et al. Glioblastoma Chemoresistance: The Double Play by Microenvironment and Blood-Brain Barrier. *Int J Mol Sci*. 2018 Sep 22;19(10):2879.

118. Kitange GJ, Carlson BL, Mladek AC, Decker PA, Schroeder MA, Wu W, et al. Evaluation of *MGMT* promoter methylation status and correlation with

temozolomide response in orthotopic glioblastoma xenograft model. *J Neurooncol.* 2009 Mar;92(1):23–31.

119. Håvik A, Brandal P, Honne H, Dahlback HS, Scheie D, Hektoen M, et al. MGMT promoter methylation in gliomas-assessment by pyrosequencing and quantitative methylation-specific PCR. *J Transl Med.* 2012;10(1):36.

120. Wipfler K, Cornish AS, Guda C. Comparative molecular characterization of typical and exceptional responders in glioblastoma. *Oncotarget.* 2018 Jun 19;9(47):28421–33.

121. Martínez-Martínez A, Martínez-Bosch J. Resonancia magnética de perfusión en astrocitomas de alto grado: el volumen sanguíneo cerebral, la altura del pico y el porcentaje de recuperación de intensidad de señal ¿pueden discriminar entre progresión y pseudoprogresión? *Radiología.* 2014 Jan;56(1):35–43.

122. Cardona AF, Rojas L, Wills B, Bernal L, Ruiz-Patiño A, Arrieta O, et al. Efficacy and safety of Levetiracetam vs. other antiepileptic drugs in Hispanic patients with glioblastoma. *J Neurooncol.* 2018 Jan;136(2):363–71.

123. Zhang J, F.G. Stevens M, D. Bradshaw T. Temozolomide: Mechanisms of Action, Repair and Resistance. *Curr Mol Pharmacol.* 2012 Jan 1;5(1):102–14.

124. Chen C, Xu T, Lu Y, Chen J, Wu S. The efficacy of temozolomide for recurrent glioblastoma multiforme. *Eur J Neurol.* 2013 Feb;20(2):223–30.

125. Gilbert MR, Dignam JJ, Armstrong TS, Wefel JS, Blumenthal DT, Vogelbaum MA, et al. A Randomized Trial of Bevacizumab for Newly Diagnosed Glioblastoma. *N Engl J Med.* 2014 Feb 20;370(8):699–708.

126. Chinot OL, Wick W, Mason W, Henriksson R, Saran F, Nishikawa R, et al. Bevacizumab plus Radiotherapy–Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma. *N Engl J Med.* 2014 Feb 20;370(8):709–22.

127. Reardon DA, Desjardins A, Peters K, Gururangan S, Sampson J, Rich JN, et al. Phase II study of metronomic chemotherapy with bevacizumab for recurrent glioblastoma after progression on bevacizumab therapy. *J Neurooncol.* 2011 Jun;103(2):371–9.

128. Prajapati HP, Ansari A. Updates in the Management of Recurrent Glioblastoma Multiforme. *J Neurol Surg Part Cent Eur Neurosurg.* 2022 Jun 30;s-0042-1749351.

129. Cardona AF, Rojas L, Wills B, Ruiz-Patiño A, Abril L, Hakim F, et al. A comprehensive analysis of factors related to carmustine/bevacizumab response in recurrent glioblastoma. *Clin Transl Oncol.* 2019 Oct;21(10):1364–73.

130. Yu MW, Quail DF. Immunotherapy for Glioblastoma: Current Progress and Challenges. *Front Immunol*. 2021 May 13;12:676301.
131. Lombardi G, Caccese M, Padovan M, Cerretti G, Pintacuda G, Manara R, et al. Regorafenib in Recurrent Glioblastoma Patients: A Large and Monocentric Real-Life Study. *Cancers*. 2021 Sep 21;13(18):4731.
132. Sim HW, Galanis E, Khasraw M. PARP Inhibitors in Glioma: A Review of Therapeutic Opportunities. *Cancers*. 2022 Feb 16;14(4):1003.
133. Bezecny P. Histone deacetylase inhibitors in glioblastoma: pre-clinical and clinical experience. *Med Oncol* [Internet]. 2014 Jun [cited 2018 Apr 27];31(6). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12032-014-0985-5>
134. Ishibashi M, Ohtsuki T. Studies on search for bioactive natural products targeting TRAIL signaling leading to tumor cell apoptosis. *Med Res Rev*. 2008 Sep;28(5):688–714.
135. Wen PY, Brandes AA. Treatment of recurrent high-grade gliomas. *Curr Opin Neurol*. 2009 Dec;22(6):657–64.
136. Chen J. Recent therapeutic advances and insights of recurrent glioblastoma multiforme. *Front Biosci*. 2013;18(2):676.
137. van der Wilt GJ, Gerhardus A, Oortwijn W. TOWARD INTEGRATION IN THE CONTEXT OF HEALTH TECHNOLOGY ASSESSMENT: THE NEED FOR EVALUATIVE FRAMEWORKS. *Int J Technol Assess Health Care*. 2017;33(05):586–90.
138. Ghosh R, Gilda JE, Gomes AV. The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of western blots. *Expert Rev Proteomics*. 2014 Oct;11(5):549–60.
139. Sonoda Y, Kumabe T, Watanabe M, Nakazato Y, Inoue T, Kanamori M, et al. Long-term survivors of glioblastoma: clinical features and molecular analysis. *Acta Neurochir (Wien)*. 2009 Nov;151(11):1349–58.
140. Zhao J, F.A. Grant S. Advances in Whole Genome Sequencing Technology. *Curr Pharm Biotechnol*. 2011 Feb 1;12(2):293–305.
141. Pareek CS, Smoczynski R, Tretyn A. Sequencing technologies and genome sequencing. *J Appl Genet*. 2011 Nov;52(4):413–35.
142. Patel LR, Nykter M, Chen K, Zhang W. Cancer genome sequencing: Understanding malignancy as a disease of the genome, its conformation, and its

evolution. *Cancer Lett.* 2013 Nov;340(2):152–60.

143. Jeans A, Esiri M. Brain histology. *Pract Neurol.* 2008 Oct 1;8(5):303–10.

144. Moch H, Blank PR, Dietel M, Elmberger G, Kerr KM, Palacios J, et al. Personalized cancer medicine and the future of pathology. *Virchows Arch.* 2012 Jan;460(1):3–8.

145. Fan B, Gu J, Wu J, Sun Y, Huang R, Shen H, et al. Circulating Abnormal Extracellular Vesicles: Their Mechanism for Crossing Blood–Brain Barrier, Effects on Central Nervous System and Detection Methods. *J Biomed Nanotechnol.* 2022 Mar 1;18(3):640–59.

146. Seckinger D, Sugarbaker E, Frankfurt O. DNA content in human cancer. Application in pathology and clinical medicine. *Arch Pathol Lab Med.* 1989 Jun;113(6):619–26.

147. Nikanjam M, Kato S, Kurzrock R. Liquid biopsy: current technology and clinical applications. *J Hematol Oncol* *J Hematol Oncol.* 2022 Sep 12;15(1):131.

148. Morganti S, Tarantino P, Ferraro E, D'Amico P, Duso BA, Curigliano G. Next Generation Sequencing (NGS): A Revolutionary Technology in Pharmacogenomics and Personalized Medicine in Cancer. In: Ruiz-Garcia E, Astudillo-de la Vega H, editors. *Translational Research and Onco-Omics Applications in the Era of Cancer Personal Genomics* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2019 [cited 2023 Feb 25]. p. 9–30. (Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 1168). Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-24100-1_2

149. Prokop JW, May T, Strong K, Bilinovich SM, Bupp C, Rajasekaran S, et al. Genome sequencing in the clinic: the past, present, and future of genomic medicine. *Physiol Genomics.* 2018 Aug 1;50(8):563–79.

150. Garber JE, Offit K. Hereditary Cancer Predisposition Syndromes. *J Clin Oncol.* 2005 Jan 10;23(2):276–92.

151. Ostrom QT, Gittleman H, Stetson L, Virk SM, Barnholtz-Sloan JS. Epidemiology of Gliomas. In: Raizer J, Parsa A, editors. *Current Understanding and Treatment of Gliomas* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2015 [cited 2017 Sep 9]. p. 1–14. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-12048-5_1

152. Levy SE, Boone BE. Next-Generation Sequencing Strategies. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2019 Jul;9(7):a025791.

153. Zacher A, Kaulich K, Stepanow S, Wolter M, Köhrer K, Felsberg J, et al. Molecular Diagnostics of Gliomas Using Next Generation Sequencing of a Glioma-Tailored Gene Panel: Next Generation Molecular Diagnostics of Gliomas. *Brain Pathol.* 2017 Mar;27(2):146–59.
154. Burian AN, Zhao W, Lo T, Thurtle- Schmidt DM. Genome sequencing guide: An introductory toolbox to whole- genome analysis methods. *Biochem Mol Biol Educ.* 2021 Sep;49(5):815–25.
155. Kawakatsu T. Whole-Genome Bisulfite Sequencing and Epigenetic Variation in Cereal Methylomes. In: Vaschetto LM, editor. *Cereal Genomics* [Internet]. New York, NY: Springer US; 2020 [cited 2023 Feb 15]. p. 119–28. (Methods in Molecular Biology; vol. 2072). Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-9865-4_10
156. Le Gallo M, Lozy F, Bell DW. Next-Generation Sequencing. In: Hedrick Ellenson L, editor. *Molecular Genetics of Endometrial Carcinoma* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2017 [cited 2022 Oct 17]. p. 119–48. (Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 943). Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-43139-0_5
157. Modi A, Vai S, Caramelli D, Lari M. The Illumina Sequencing Protocol and the NovaSeq 6000 System. In: Mengoni A, Bacci G, Fondi M, editors. *Bacterial Pangenomics* [Internet]. New York, NY: Springer US; 2021 [cited 2023 Feb 15]. p. 15–42. (Methods in Molecular Biology; vol. 2242). Available from: https://link.springer.com/10.1007/978-1-0716-1099-2_2
158. Zhao EY, Jones M, Jones SJM. Whole-Genome Sequencing in Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2019 Mar;9(3):a034579.
159. McCombie WR, McPherson JD, Mardis ER. Next-Generation Sequencing Technologies. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2019 Nov;9(11):a036798.
160. Petrackova A, Vasinek M, Sedlarikova L, Dyskova T, Schneiderova P, Novosad T, et al. Standardization of Sequencing Coverage Depth in NGS: Recommendation for Detection of Clonal and Subclonal Mutations in Cancer Diagnostics. *Front Oncol.* 2019 Sep 4;9:851.
161. Pfeifer JD. Clinical next generation sequencing in cancer. *Cancer Genet.* 2013 Dec;206(12):409–12.
162. Zhang H, Bian C, Tu S, Yin F, Guo P, Zhang J, et al. Integrated analysis of lncRNA-miRNA-mRNA ceRNA network in human aortic dissection. *BMC*

Genomics. 2021 Dec;22(1):724.

163. Li J, Zhao Y, Tian S, Xu C, Cai Y, Li K, et al. Genetic alteration and clonal evolution of primary glioblastoma into secondary gliosarcoma. *CNS Neurosci Ther*. 2021 Dec;27(12):1483–92.

164. Sasaki MS, Kato M, Toguchida J, Yamaguchi T, Ejima Y, Ishizaki K, et al. Somatic and Germinal Mutations of Tumor-Suppressor Genes in the Development of Cancer. *J Radiat Res (Tokyo)*. 1991;32(SUPPLEMENT2):266–76.

165. McKinzie PB, Bishop ME. A Streamlined and High-Throughput Error-Corrected Next-Generation Sequencing Method for Low Variant Allele Frequency Quantitation. *Toxicol Sci*. 2019 Oct 17;kfz221.

166. Geschwind DH, Klein C, editors. *Neurogenetics*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier; 2018. 2 p. (Handbook of clinical neurology).

167. Santosh V, Sravya P, Arivazhagan A. Molecular Pathology of Glioblastoma-An Update. In: Somasundaram K, editor. *Advances in Biology and Treatment of Glioblastoma* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2017 [cited 2018 Sep 21]. p. 19–55. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-56820-1_2

168. Bewicke-Copley F, Arjun Kumar E, Palladino G, Korfi K, Wang J. Applications and analysis of targeted genomic sequencing in cancer studies. *Comput Struct Biotechnol J*. 2019;17:1348–59.

169. Lauer S, Gresham D. An evolving view of copy number variants. *Curr Genet*. 2019 Dec;65(6):1287–95.

170. Wen PY, Stein A, van den Bent M, De Greve J, Wick A, de Vos FYFL, et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with BRAFV600E-mutant low-grade and high-grade glioma (ROAR): a multicentre, open-label, single-arm, phase 2, basket trial. *Lancet Oncol*. 2022 Jan;23(1):53–64.

171. Favello A, Hillier L, Wilson RK. Chapter 23 Genomic DNA Sequencing Methods. In: *Methods in Cell Biology* [Internet]. Elsevier; 1995 [cited 2022 Oct 17]. p. 551–69. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091679X0861403X>

172. Bobos M. Histopathologic classification and prognostic factors of melanoma: a 2021 update. *Ital J Dermatol Venereol* [Internet]. 2021 Jul [cited 2023 Feb 18];156(3). Available from: <https://www.minervamedica.it/index2.php?show=R23Y2021N03A0300>

173. Holsinger KE, Weir BS. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting *F_{ST}*. *Nat Rev Genet*. 2009 Sep;10(9):639–50.
174. Tu B, Xiang H, Li M, Zhong F, Fang M, Yan W. In Silico Analysis of the Correlation of KIF2C with Prognosis and Immune Infiltration in Glioma. Shi J, editor. *Comput Math Methods Med*. 2022 Mar 27;2022:1–22.
175. Ribot EJ, Miraux S, Konsman JP, Bouchaud V, Pourtau L, Delville MH, et al. In vivo MR tracking of therapeutic microglia to a human glioma model: THERAPEUTIC MICROGLIA MR TRACKING TO HUMAN GLIOMA. *NMR Biomed*. 2011 Dec;24(10):1361–8.
176. Renault IZ, Golgher D. Molecular Genetics of Glioblastomas. *Neuroimaging Clin N Am*. 2015 Feb;25(1):97–103.
177. Lambrugh M, Tiberti M, Allega MF, Sora V, Nygaard M, Toth A, et al. Analyzing Biomolecular Ensembles. In: Bonomi M, Camilloni C, editors. *Biomolecular Simulations [Internet]*. New York, NY: Springer New York; 2019 [cited 2023 Feb 25]. p. 415–51. (Methods in Molecular Biology; vol. 2022). Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-9608-7_18
178. Milbury CA, Creeden J, Yip WK, Smith DL, Pattani V, Maxwell K, et al. Clinical and analytical validation of FoundationOne®CDx, a comprehensive genomic profiling assay for solid tumors. Vousden G, editor. *PLOS ONE*. 2022 Mar 16;17(3):e0264138.
179. Gou LY, Niu FY, Wu YL, Zhong WZ. Differences in driver genes between smoking-related and non-smoking-related lung cancer in the Chinese population: Differences in Driver Genes. *Cancer*. 2015 Sep 1;121(S17):3069–79.
180. Touat M, Li YY, Boynton AN, Spurr LF, Iorgulescu JB, Bohrsen CL, et al. Mechanisms and therapeutic implications of hypermutation in gliomas. *Nature*. 2020 Apr 23;580(7804):517–23.
181. Baretta M, Le DT. DNA mismatch repair in cancer. *Pharmacol Ther*. 2018 Sep;189:45–62.
182. Gong T, Hayes VM, Chan EKF. Detection of somatic structural variants from short-read next-generation sequencing data. *Brief Bioinform*. 2021 May 20;22(3):bbaa056.
183. Woodhouse R, Li M, Hughes J, Delfosse D, Skoletsy J, Ma P, et al. Clinical and analytical validation of FoundationOne Liquid CDx, a novel 324-Gene cfDNA-based comprehensive genomic profiling assay for cancers of solid tumor origin. *Ha*

P, editor. PLOS ONE. 2020 Sep 25;15(9):e0237802.

184. Yang PH, Tao Y, Luo J, Paturu M, Lu HC, Ramkissoon S, et al. Multivariate analysis of associations between clinical sequencing and outcome in glioblastoma. *Neuro-Oncol Adv*. 2022 Jan 1;4(1):vdac002.

185. Massoud TF, Paulmurugan R, editors. *Glioblastoma resistance to chemotherapy: molecular mechanisms and innovative reversal strategies*. 1st ed. San Diego: Academic Press is an imprint of Elsevier; 2021.

186. Alivand MR, Najafi S, Esmaeili S, Rahmanpour D, Zhaleh H, Rahmati Y. Integrative analysis of DNA methylation and gene expression profiles to identify biomarkers of glioblastoma. *Cancer Genet*. 2021 Nov;258–259:135–50.

187. Ohgaki H, Kleihues P. The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma. *Clin Cancer Res*. 2013 Feb 15;19(4):764–72.

188. KOMORI T. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System: The Major Points of Revision. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2017 Jul;57(7):301–11.

189. van den Bent MJ, Smits M, Kros JM, Chang SM. Diffuse Infiltrating Oligodendroglioma and Astrocytoma. *J Clin Oncol*. 2017 Jul 20;35(21):2394–401.

190. Somasundaram K, editor. *Advances in Biology and Treatment of Glioblastoma* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2017 [cited 2023 Feb 25]. (Current Cancer Research). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-56820-1>

191. Brognaro E. The inverse paradigm and the ancestral cell of IDH-wildtype glioblastoma. *Clin Transl Oncol*. 2022 Jan;24(1):13–23.

192. Tateishi K, Yamamoto T. *IDH -Mutant Gliomas*. In: Roy Morgan L, Birol Sarica F, editors. *Brain and Spinal Tumors - Primary and Secondary* [Internet]. IntechOpen; 2020 [cited 2021 Nov 28]. Available from: <https://www.intechopen.com/books/brain-and-spinal-tumors-primary-and-secondary/-em-idh-em-mutant-gliomas>

193. Khan I, Waqas M, Shamim MS. Prognostic significance of IDH 1 mutation in patients with glioblastoma multiforme. *JPMA J Pak Med Assoc*. 2017 May;67(5):816–7.

194. Han S, Liu Y, Cai SJ, Qian M, Ding J, Larion M, et al. IDH mutation in glioma: molecular mechanisms and potential therapeutic targets. *Br J Cancer*.

2020 May 26;122(11):1580–9.

195. Eckel-Passow JE, Lachance DH, Molinaro AM, Walsh KM, Decker PA, Sicotte H, et al. Glioma Groups Based on 1p/19q, *IDH*, and *TERT* Promoter Mutations in Tumors. *N Engl J Med*. 2015 Jun 25;372(26):2499–508.

196. Wesseling P, van den Bent M, Perry A. Oligodendroglioma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2015 Jun;129(6):809–27.

197. Bettegowda C, Agrawal N, Jiao Y, Sausen M, Wood LD, Hruban RH, et al. Mutations in *CIC* and *FUBP1* Contribute to Human Oligodendroglioma. *Science*. 2011 Sep 9;333(6048):1453–5.

198. Lorbeer FK, Hockemeyer D. *TERT* promoter mutations and telomeres during tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev*. 2020 Feb;60:56–62.

199. Brandner S. Molecular Diagnostics of Adult Gliomas in Neuropathological Practice. *Acta Medica Acad*. 2021 May 26;50(1):29.

200. Vuong HG, Altibi AMA, Duong UNP, Ngo HTT, Pham TQ, Chan AKY, et al. *TERT* promoter mutation and its interaction with *IDH* mutations in glioma: Combined *TERT* promoter and *IDH* mutations stratifies lower-grade glioma into distinct survival subgroups—A meta-analysis of aggregate data. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017 Dec;120:1–9.

201. Shabani M, Taghvaei Javanshir H, Bereimipour A, Ebrahimi Sadrabadi A, Jalili A, Nayernia K. Contradictory Effect of Notch1 and Notch2 on Phosphatase and Tensin Homolog and its Influence on Glioblastoma Angiogenesis. *Galen Med J*. 2021 Oct 5;10:e2091.

202. Zhang X, Chen T, Zhang J, Mao Q, Li S, Xiong W, et al. Notch1 promotes glioma cell migration and invasion by stimulating β -catenin and NF- κ B signaling via AKT activation. *Cancer Sci*. 2012 Feb;103(2):181–90.

203. Tobochnik S, Pisano W, Lapinskas E, Ligon KL, Lee JW. Effect of *PIK3CA* variants on glioma-related epilepsy and response to treatment. *Epilepsy Res*. 2021 Sep;175:106681.

204. Haase S, Garcia-Fabiani MB, Carney S, Altshuler D, Núñez FJ, Méndez FM, et al. Mutant *ATRX*: uncovering a new therapeutic target for glioma. *Expert Opin Ther Targets*. 2018 Jul 3;22(7):599–613.

205. Takami H, Yoshida A, Fukushima S, Arita H, Matsushita Y, Nakamura T, et al. Revisiting *TP 53* Mutations and Immunohistochemistry—A Comparative Study in

157 Diffuse Gliomas: *TP53* Mutations and Immunohistochemistry in Gliomas. *Brain Pathol.* 2015 May;25(3):256–65.

206. Pessôa IA, Amorim CK, Ferreira WAS, Sagica F, Brito JR, Othman M, et al. Detection and Correlation of Single and Concomitant TP53, PTEN, and CDKN2A Alterations in Gliomas. *Int J Mol Sci.* 2019 May 30;20(11):2658.

207. Zhang C, Burger MC, Jennewein L, Genßler S, Schönfeld K, Zeiner P, et al. ErbB2/HER2-Specific NK Cells for Targeted Therapy of Glioblastoma. *JNCI J Natl Cancer Inst [Internet].* 2016 May [cited 2022 Jun 19];108(5). Available from: <https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/djv375>

208. Jaiswal BS, Kljavin NM, Stawiski EW, Chan E, Parikh C, Durinck S, et al. Oncogenic ERBB3 Mutations in Human Cancers. *Cancer Cell.* 2013 May;23(5):603–17.

209. Li WQ, Cui JW. Non-small cell lung cancer patients with ex19del or exon 21 L858R mutation: distinct mechanisms, different efficacies to treatments. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2020 Sep;146(9):2329–38.

210. An Z, Aksoy O, Zheng T, Fan QW, Weiss WA. Epidermal growth factor receptor and EGFRvIII in glioblastoma: signaling pathways and targeted therapies. *Oncogene.* 2018 Mar;37(12):1561–75.

211. Stichel D, Ebrahimi A, Reuss D, Schrimpf D, Ono T, Shirahata M, et al. Distribution of EGFR amplification, combined chromosome 7 gain and chromosome 10 loss, and TERT promoter mutation in brain tumors and their potential for the reclassification of IDHwt astrocytoma to glioblastoma. *Acta Neuropathol (Berl).* 2018 Nov;136(5):793–803.

212. Korshunov A, Ryzhova M, Hovestadt V, Bender S, Sturm D, Capper D, et al. Integrated analysis of pediatric glioblastoma reveals a subset of biologically favorable tumors with associated molecular prognostic markers. *Acta Neuropathol (Berl).* 2015 May;129(5):669–78.

213. Ahmadloo N, Kani AA, Mohammadianpanah M, Nasrolahi H, Omidvari S, Mosalaei A, et al. Treatment outcome and prognostic factors of adult glioblastoma multiforme. *J Egypt Natl Cancer Inst.* 2013 Mar;25(1):21–30.

214. Chambless LB, Kistka HM, Parker SL, Hassam-Malani L, McGirt MJ, Thompson RC. The relative value of postoperative versus preoperative Karnofsky Performance Scale scores as a predictor of survival after surgical resection of

- glioblastoma multiforme. *J Neurooncol*. 2015 Jan;121(2):359–64.
215. Osorio JA, Aghi MK. Optimizing glioblastoma resection: intraoperative mapping and beyond. *CNS Oncol*. 2014 Sep;3(5):359–66.
216. Molinaro AM, Hervey-Jumper S, Morshed RA, Young J, Han SJ, Chunduru P, et al. Association of Maximal Extent of Resection of Contrast-Enhanced and Non-Contrast-Enhanced Tumor With Survival Within Molecular Subgroups of Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma. *JAMA Oncol*. 2020 Apr 1;6(4):495.
217. McGirt MJ, Chaichana KL, Gathinji M, Attenello FJ, Than K, Olivi A, et al. Independent association of extent of resection with survival in patients with malignant brain astrocytoma: Clinical article. *J Neurosurg*. 2009 Jan;110(1):156–62.
218. Fritz P, Becker F, Kuttig H, zum Winkel K. [Results of local radiotherapy and modified total-brain irradiation in astrocytoma]. *Strahlenther Onkol Organ Dtsch Rontgengesellschaft AI*. 1989 Aug;165(8):571–7.
219. Olar A, Aldape KD. Using the molecular classification of glioblastoma to inform personalized treatment: Molecular classification of glioblastoma. *J Pathol*. 2014 Jan;232(2):165–77.
220. Daumas-Duport C, Scheithauer B, O'Fallon J, Kelly P. Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method. *Cancer*. 1988 Nov 15;62(10):2152–65.
221. Yang P, Zhang W, Wang Y, Peng X, Chen B, Qiu X, et al. IDH mutation and MGMT promoter methylation in glioblastoma: results of a prospective registry. *Oncotarget* [Internet]. 2015 Dec 1 [cited 2018 May 27];6(38). Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/5683>
222. Erice O, Smith MP, White R, Goicoechea I, Barriuso J, Jones C, et al. MGMT Expression Predicts PARP-Mediated Resistance to Temozolomide. *Mol Cancer Ther*. 2015 May 1;14(5):1236–46.
223. Philteos J, Karmur BS, Mansouri A. MGMT Testing in Glioblastomas: Pitfalls and Opportunities. *Am J Clin Oncol*. 2019 Feb;42(2):117–22.
224. Liu F, Hon GC, Villa GR, Turner KM, Ikegami S, Yang H, et al. EGFR Mutation Promotes Glioblastoma through Epigenome and Transcription Factor Network Remodeling. *Mol Cell*. 2015 Oct;60(2):307–18.

225. Juratli TA, Kirsch M, Geiger K, Klink B, Leipnitz E, Pinzer T, et al. The prognostic value of IDH mutations and MGMT promoter status in secondary high-grade gliomas. *J Neurooncol.* 2012 Dec;110(3):325–33.
226. Sabel M, Reifenberger J, Weber RG, Reifenberger G, Schmitt HP. Long-term survival of a patient with giant cell glioblastoma: Case report. *J Neurosurg.* 2001 Apr;94(4):605–11.
227. Holdhoff M, Rothenberger R, Browner IE. Glioblastoma in older adults. *Aging.* 2018 Feb 1;10(2):154–5.
228. Cheng W, Ren X, Cai J, Zhang C, Li M, Wang K, et al. A five-miRNA signature with prognostic and predictive value for *MGMT* promoter-methylated glioblastoma patients. *Oncotarget* [Internet]. 2015 Oct 6 [cited 2018 May 27];6(30). Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/4978>
229. Park JH, de Lomana ALG, Marzese DM, Juarez T, Feroze A, Hothi P, et al. A Systems Approach to Brain Tumor Treatment. *Cancers.* 2021 Jun 24;13(13):3152.
230. Panovska D, De Smet F. Functional Precision Oncology: The Next Frontier to Improve Glioblastoma Outcome? *Int J Mol Sci.* 2022 Aug 3;23(15):8637.
231. Messaoudi K, Clavreul A, Lagarce F. Toward an effective strategy in glioblastoma treatment. Part I: resistance mechanisms and strategies to overcome resistance of glioblastoma to temozolomide. *Drug Discov Today.* 2015 Jul;20(7):899–905.
232. Strobel H, Baisch T, Fitzel R, Schilberg K, Siegelin MD, Karpel-Massler G, et al. Temozolomide and Other Alkylating Agents in Glioblastoma Therapy. *Biomedicines.* 2019 Sep 9;7(3):69.
233. St-Coeur PD, Poitras JJ, Cuperlovic-Culf M, Touaibia M, Morin PJ. Investigating a signature of temozolomide resistance in GBM cell lines using metabolomics. *J Neurooncol.* 2015 Oct;125(1):91–102.
234. Yeom SY, Nam DH, Park C. RRAD Promotes EGFR-Mediated STAT3 Activation and Induces Temozolomide Resistance of Malignant Glioblastoma. *Mol Cancer Ther.* 2014 Dec 1;13(12):3049–61.
235. Masliantsev K, Pinel B, Balbous A, Guichet PO, Tachon G, Milin S, et al. Impact of STAT3 phosphorylation in glioblastoma stem cells radiosensitization and

patient outcome. *Oncotarget*. 2018 Jan 9;9(3):3968–79.

236. Daniel P, Sabri S, Chaddad A, Meehan B, Jean-Claude B, Rak J, et al. Temozolomide Induced Hypermutation in Glioma: Evolutionary Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Front Oncol*. 2019 Feb 4;9:41.

237. Tomar VS, Patil V, Somasundaram K. Temozolomide induces activation of Wnt/ β -catenin signaling in glioma cells via PI3K/Akt pathway: implications in glioma therapy. *Cell Biol Toxicol*. 2020 Jun;36(3):273–8.

238. Zeng H, Yang Z, Xu N, Liu B, Fu Z, Lian C, et al. Connective tissue growth factor promotes temozolomide resistance in glioblastoma through TGF- β 1-dependent activation of Smad/ERK signaling. *Cell Death Dis*. 2017 Jun 15;8(6):e2885–e2885.

239. Zhi T, Yu T, Pan M, Nie E, Wu W, Wang X, et al. EZH2 alteration driven by microRNA-524-5p and microRNA-324-5p promotes cell proliferation and temozolomide resistance in glioma. *Oncotarget*. 2017 Nov 10;8(56):96239–48.

240. Ulasov IV, Mijanovic O, Savchuk S, Gonzalez- Buendia E, Sonabend A, Xiao T, et al. TMZ regulates GBM stemness *via* MMP14- DLL4- Notch3 pathway. *Int J Cancer*. 2020 Apr 15;146(8):2218–28.

241. Semreen AM, Alsoud LO, El-Huneidi W, Ahmed M, Bustanji Y, Abu-Gharbieh E, et al. Metabolomics Analysis Revealed Significant Metabolic Changes in Brain Cancer Cells Treated with Paclitaxel and/or Etoposide. *Int J Mol Sci*. 2022 Nov 11;23(22):13940.

242. Liau BB, Sievers C, Donohue LK, Gillespie SM, Flavahan WA, Miller TE, et al. Adaptive Chromatin Remodeling Drives Glioblastoma Stem Cell Plasticity and Drug Tolerance. *Cell Stem Cell*. 2017 Feb;20(2):233-246.e7.

243. Ge X, Pan MH, Wang L, Li W, Jiang C, He J, et al. Hypoxia-mediated mitochondria apoptosis inhibition induces temozolomide treatment resistance through miR-26a/Bad/Bax axis. *Cell Death Dis*. 2018 Nov 13;9(11):1128.

244. Wu W, Wu Y, Mayer K, von Rosenstiel C, Schecker J, Baur S, et al. Lipid Peroxidation Plays an Important Role in Chemotherapeutic Effects of Temozolomide and the Development of Therapy Resistance in Human Glioblastoma. *Transl Oncol*. 2020 Mar;13(3):100748.

245. Lee SY. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes Dis*. 2016 Sep;3(3):198–210.

246. Kang C. Inhibition of STAT3 reverses alkylator resistance through modulation of the AKT and β -catenin signaling pathways. *Oncol Rep* [Internet]. 2011 Jul 19 [cited 2023 Feb 20]; Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2011.1396>
247. Persano L, Pistollato F, Rampazzo E, Della Puppa A, Abbadi S, Frasson C, et al. BMP2 sensitizes glioblastoma stem-like cells to Temozolomide by affecting HIF-1 α stability and MGMT expression. *Cell Death Dis*. 2012 Oct 18;3(10):e412–e412.
248. Chen D, Kang X, Li Z, Chen L, Ma Q, Fan P. Hedgehog/GLI1 signaling pathway regulates the resistance to cisplatin in human osteosarcoma. *J Cancer*. 2021;12(22):6676–84.
249. Wickström M, Dyberg C, Milosevic J, Einvik C, Calero R, Sveinbjörnsson B, et al. Wnt/ β -catenin pathway regulates MGMT gene expression in cancer and inhibition of Wnt signalling prevents chemoresistance. *Nat Commun*. 2015 Nov 25;6(1):8904.
250. Lee SY. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes Dis*. 2016 Sep;3(3):198–210.
251. Hegi ME, Liu L, Herman JG, Stupp R, Wick W, Weller M, et al. Correlation of O⁶-Methylguanine Methyltransferase (MGMT) Promoter Methylation With Clinical Outcomes in Glioblastoma and Clinical Strategies to Modulate MGMT Activity. *J Clin Oncol*. 2008 Sep 1;26(25):4189–99.
252. Silber JR, Mueller BA, Ewers TG, Berger MS. Comparison of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase activity in brain tumors and adjacent normal brain. *Cancer Res*. 1993 Jul 15;53(14):3416–20.
253. Beier D, Röhrl S, Pillai DR, Schwarz S, Kunz-Schughart LA, Leukel P, et al. Temozolomide Preferentially Depletes Cancer Stem Cells in Glioblastoma. *Cancer Res*. 2008 Jul 15;68(14):5706–15.
254. Yi G zhong, Huang G, Guo M, Zhang X, Wang H, Deng S, et al. Acquired temozolomide resistance in MGMT-deficient glioblastoma cells is associated with regulation of DNA repair by DHC2. *Brain*. 2019 Aug 1;142(8):2352–66.
255. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*. 2008 Oct 23;455(7216):1061–8.
256. Wachsberger PR, Lawrence RY, Liu Y, Rice B, Daskalakis C, Dicker AP. Epidermal Growth Factor Receptor Mutation Status and Rad51 Determine the

Response of Glioblastoma to Multimodality Therapy with Cetuximab, Temozolomide, and Radiation. *Front Oncol* [Internet]. 2013 [cited 2023 Feb 20];3. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2013.00013/abstract>

257. Flüh C, Chitadze G, Adamski V, Hattermann K, Synowitz M, Kabelitz D, et al. NKG2D ligands in glioma stem-like cells: expression in situ and in vitro. *Histochem Cell Biol*. 2018 Mar;149(3):219–33.

258. Zhang W, Yan W, You G, Bao Z, Wang Y, Liu Y, et al. Genome-wide DNA methylation profiling identifies ALDH1A3 promoter methylation as a prognostic predictor in G-CIMP– primary glioblastoma. *Cancer Lett*. 2013 Jan;328(1):120–5.

259. Rodrigues AR, Neto FSL, Lourenço LG, Trevisan FA, Cirino MLA, Nery B, et al. Research Article Expression of oncogenic microRNA-21 in neurospheres and attached cells of a glioblastoma cell line increased after treatment with temozolomide and ionizing radiation. *Genet Mol Res* [Internet]. 2019 [cited 2023 Feb 20];18(2). Available from: http://www.funpecrp.com.br/gmr/articles/year2019/vol18-2/pdf/gmr18095_-_expression-oncogenic-microrna-21-neurospheres-and-attached-cells-glioblastoma-cell-line.pdf

260. Yan W, Liu Y, Yang P, Wang Z, You Y, Jiang T. MicroRNA profiling of Chinese primary glioblastoma reveals a temozolomide-chemoresistant subtype. *Oncotarget*. 2015 May 10;6(13):11676–82.

261. Li Z, Zhang J, Zheng H, Li C, Xiong J, Wang W, et al. Modulating lncRNA SNHG15/CDK6/miR-627 circuit by palbociclib, overcomes temozolomide resistance and reduces M2-polarization of glioma associated microglia in glioblastoma multiforme. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019 Dec;38(1):380.

262. Kitange GJ, Mladek AC, Schroeder MA, Pokorny JC, Carlson BL, Zhang Y, et al. Retinoblastoma Binding Protein 4 Modulates Temozolomide Sensitivity in Glioblastoma by Regulating DNA Repair Proteins. *Cell Rep*. 2016 Mar;14(11):2587–98.

263. Chen D, Song M, Mohamad O, Yu SP. Inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase induces hybrid cell death and enhanced sensitivity to chemotherapy in human glioblastoma cells. *BMC Cancer*. 2014 Dec;14(1):716.

264. Xu Y, Stamenkovic I, Yu Q. CD44 Attenuates Activation of the Hippo Signaling Pathway and Is a Prime Therapeutic Target for Glioblastoma. *Cancer Res*. 2010 Mar 15;70(6):2455–64.

265. Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, et al. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol*

Cancer. 2006 Dec;5(1):67.

266. Lee SY, Liu S, Mitchell RM, Slagle-Webb B, Hong YS, Sheehan JM, et al. HFE polymorphisms influence the response to chemotherapeutic agents via induction of p16INK4A. *Int J Cancer*. 2011 Nov 1;129(9):2104–14.

267. Tsai YT, Wu AC, Yang WB, Kao TJ, Chuang JY, Chang WC, et al. ANGPTL4 Induces TMZ Resistance of Glioblastoma by Promoting Cancer Stemness Enrichment via the EGFR/AKT/4E-BP1 Cascade. *Int J Mol Sci*. 2019 Nov 11;20(22):5625.

268. Chen X, Zhang M, Gan H, Wang H, Lee JH, Fang D, et al. A novel enhancer regulates MGMT expression and promotes temozolomide resistance in glioblastoma. *Nat Commun*. 2018 Dec;9(1):2949.

269. Munoz JL, Rodriguez-Cruz V, Greco SJ, Ramkissoon SH, Ligon KL, Rameshwar P. Temozolomide resistance in glioblastoma cells occurs partly through epidermal growth factor receptor-mediated induction of connexin 43. *Cell Death Dis*. 2014 Mar 27;5(3):e1145–e1145.

270. Ueno H, Tomiyama A, Yamaguchi H, Uekita T, Shirakihara T, Nakashima K, et al. Augmentation of invadopodia formation in temozolomide-resistant or adopted glioma is regulated by c-Jun terminal kinase–paxillin axis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Dec;468(1–2):240–7.

271. Munoz JL, Rodriguez-Cruz V, Ramkissoon SH, Ligon KL, Greco SJ, Rameshwar P. Temozolomide resistance in glioblastoma occurs by miRNA-9-targeted PTCH1, independent of sonic hedgehog level. *Oncotarget*. 2015 Jan 20;6(2):1190–201.

272. Yu X, Wang M, Zuo J, Wahafu A, Mao P, Li R, et al. Nuclear factor I A promotes temozolomide resistance in glioblastoma via activation of nuclear factor κ B pathway. *Life Sci*. 2019 Nov;236:116917.

273. Bredel M, Bredel C, Juric D, Duran GE, Yu RX, Harsh GR, et al. Tumor Necrosis Factor- α -Induced Protein 3 As a Putative Regulator of Nuclear Factor- κ B-Mediated Resistance to O⁶-Alkylating Agents in Human Glioblastomas. *J Clin Oncol*. 2006 Jan 10;24(2):274–87.

274. Yi G zhong, Xiang W, Feng W yan, Chen Z yang, Li Y min, Deng S ze, et al. Identification of Key Candidate Proteins and Pathways Associated with Temozolomide Resistance in Glioblastoma Based on Subcellular Proteomics and Bioinformatical Analysis. *BioMed Res Int*. 2018;2018:1–12.

275. Haas B, Klinger V, Keksel C, Bonigut V, Kiefer D, Caspers J, et al. Inhibition of the PI3K but not the MEK/ERK pathway sensitizes human glioma cells to alkylating drugs. *Cancer Cell Int.* 2018 Dec;18(1):69.
276. Velpula KK, Guda MR, Sahu K, Tuszynski J, Asuthkar S, Bach SE, et al. Metabolic targeting of EGFRvIII/PDK1 axis in temozolomide resistant glioblastoma. *Oncotarget.* 2017 May 30;8(22):35639–55.
277. Yeom SY, Nam DH, Park C. RRAD Promotes EGFR-Mediated STAT3 Activation and Induces Temozolomide Resistance of Malignant Glioblastoma. *Mol Cancer Ther.* 2014 Dec 1;13(12):3049–61.
278. Kiss. Temozolomide-induced modification of the CXC chemokine network in experimental gliomas. *Int J Oncol [Internet].* 2011 May 1 [cited 2023 Feb 26];38(5). Available from: <http://www.spandidos-publications.com/ijo/38/5/1453>
279. Yi L, Zhou X, Li T, Liu P, Hai L, Tong L, et al. Notch1 signaling pathway promotes invasion, self-renewal and growth of glioma initiating cells via modulating chemokine system CXCL12/CXCR4. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019 Dec;38(1):339.
280. Ma J, Murphy M, O'Dwyer PJ, Berman E, Reed K, Gallo JM. Biochemical changes associated with a multidrug-resistant phenotype of a human glioma cell line with temozolomide-acquired resistance. *Biochem Pharmacol.* 2002 Apr;63(7):1219–28.
281. Ujifuku K, Mitsutake N, Takakura S, Matsuse M, Saenko V, Suzuki K, et al. miR-195, miR-455-3p and miR-10a* are implicated in acquired temozolomide resistance in glioblastoma multiforme cells. *Cancer Lett.* 2010 Oct;296(2):241–8.
282. Oliva CR, Nozell SE, Diers A, McClugage SG, Sarkaria JN, Markert JM, et al. Acquisition of Temozolomide Chemoresistance in Gliomas Leads to Remodeling of Mitochondrial Electron Transport Chain. *J Biol Chem.* 2010 Dec;285(51):39759–67.
283. Lee ES, Ko KK, Joe YA, Kang SG, Hong YK. Inhibition of STAT3 reverses drug resistance acquired in temozolomide-resistant human glioma cells. *Oncol Lett.* 2011 Jan;2(1):115–21.
284. Zhang J, Stevens MFG, Laughton CA, Madhusudan S, Bradshaw TD. Acquired Resistance to Temozolomide in Glioma Cell Lines: Molecular Mechanisms and Potential Translational Applications. *Oncology.* 2010;78(2):103–14.
285. Stojic L, Brun R, Jiricny J. Mismatch repair and DNA damage signalling. *DNA Repair.* 2004 Aug;3(8–9):1091–101.

286. Buruiană A, Florian Ștefan I, Florian AI, Timiș TL, Mișu CM, Miclăuș M, et al. The Roles of miRNA in Glioblastoma Tumor Cell Communication: Diplomatic and Aggressive Negotiations. *Int J Mol Sci*. 2020 Mar 12;21(6):1950.
287. Yin J, Zeng A, Zhang Z, Shi Z, Yan W, You Y. Exosomal transfer of miR-1238 contributes to temozolomide-resistance in glioblastoma. *EBioMedicine*. 2019 Apr;42:238–51.
288. Tian T, Mingyi M, Qiu X, Qiu Y. MicroRNA-101 reverses temozolomide resistance by inhibition of GSK3 β in glioblastoma. *Oncotarget*. 2016 Nov 29;7(48):79584–95.
289. Luo W, Yan D, Song Z, Zhu X, Liu X, Li X, et al. miR-126-3p sensitizes glioblastoma cells to temozolomide by inactivating Wnt/ β -catenin signaling via targeting SOX2. *Life Sci*. 2019 Jun;226:98–106.
290. Qian Z, Zhou S, Zhou Z, Yang X, Que S, Lan J, et al. miR-146b-5p suppresses glioblastoma cell resistance to temozolomide through targeting TRAF6. *Oncol Rep*. 2017 Nov;38(5):2941–50.
291. Li H, Chen L, Li J jie, Zhou Q, Huang A, Liu W wen, et al. miR-519a enhances chemosensitivity and promotes autophagy in glioblastoma by targeting STAT3/Bcl2 signaling pathway. *J Hematol Oncol J Hematol Oncol*. 2018 Dec;11(1):70.
292. Cai T, Liu Y, Xiao J. Long noncoding RNA MALAT1 knockdown reverses chemoresistance to temozolomide via promoting microRNA-101 in glioblastoma. *Cancer Med*. 2018 Apr;7(4):1404–15.
293. Shea A, Harish V, Afzal Z, Chijioke J, Kedir H, Dusmatova S, et al. MicroRNAs in glioblastoma multiforme pathogenesis and therapeutics. *Cancer Med*. 2016 Aug;5(8):1917–46.
294. Yan Y, Xu Z, Chen X, Wang X, Zeng S, Zhao Z, et al. Novel Function of lncRNA ADAMTS9-AS2 in Promoting Temozolomide Resistance in Glioblastoma via Upregulating the FUS/MDM2 Ubiquitination Axis. *Front Cell Dev Biol*. 2019 Oct 2;7:217.
295. Jin W. Role of JAK/STAT3 Signaling in the Regulation of Metastasis, the Transition of Cancer Stem Cells, and Chemoresistance of Cancer by Epithelial–Mesenchymal Transition. *Cells*. 2020 Jan 15;9(1):217.
296. Koschmann C, Calinescu AA, Nunez FJ, Mackay A, Fazal-Salom J, Thomas D, et al. ATRX loss promotes tumor growth and impairs nonhomologous end joining DNA repair in glioma. *Sci Transl Med*. 2016 Mar 2;8(328):328ra28–328ra28.

297. Mohammad F, Weissmann S, Leblanc B, Pandey DP, Højfeldt JW, Comet I, et al. EZH2 is a potential therapeutic target for H3K27M-mutant pediatric gliomas. *Nat Med*. 2017 Apr;23(4):483–92.
298. Wańkiewicz P, Nowacki P. [GLIOBLASTOMA MULTIFORME--THE PROGRESS OF KNOWLEDGE ON THE PATHOGENESIS OF CANCER]. *Ann Acad Med Stetin*. 2014;60(2):40–3.
299. Lathia JD, Hitomi M, Gallagher J, Gadani SP, Adkins J, VasANJI A, et al. Distribution of CD133 reveals glioma stem cells self-renew through symmetric and asymmetric cell divisions. *Cell Death Dis*. 2011 Sep 1;2(9):e200–e200.
300. Lee JH, Lee JH. The origin-of-cell harboring cancer-driving mutations in human glioblastoma. *BMB Rep*. 2018 Oct 31;51(10):481–3.
301. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 2006 Dec;444(7120):756–60.
302. Chen J, Li Y, Yu TS, McKay RM, Burns DK, Kernie SG, et al. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature*. 2012 Aug;488(7412):522–6.
303. Annovazzi L, Mellai M, Schiffer D. Chemotherapeutic Drugs: DNA Damage and Repair in Glioblastoma. *Cancers*. 2017 May 26;9(6):57.
304. Toledo-Guzmán ME, Hernández MI, Gómez-Gallegos AA, Ortiz-Sánchez E. ALDH as a Stem Cell Marker in Solid Tumors. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2019 Jul 4;14(5):375–88.
305. Broadley KWR, Hunn MK, Farrand KJ, Price KM, Grasso C, Miller RJ, et al. Side Population is Not Necessary or Sufficient for a Cancer Stem Cell Phenotype in Glioblastoma Multiforme. *Stem Cells*. 2011 Mar 1;29(3):452–61.
306. Auffinger B, Spencer D, Pytel P, Ahmed AU, Lesniak MS. The role of glioma stem cells in chemotherapy resistance and glioblastoma multiforme recurrence. *Expert Rev Neurother*. 2015 Jul 3;15(7):741–52.
307. Beier D, Schulz JB, Beier CP. Chemoresistance of glioblastoma cancer stem cells - much more complex than expected. *Mol Cancer*. 2011;10(1):128.
308. Cambio de paradigmas - una actualización sobre el manejo multidisciplinario del glioma maligno. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2017 Sep 9]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih->

309. Yang B, Han N, Sun J, Jiang H, Xu HY. CtIP contributes to non-homologous end joining formation through interacting with ligase IV and promotion of TMZ resistance in glioma cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2019 Mar;23(5):2092–102.
310. Annovazzi L, Mellai M, Schiffer D. Chemotherapeutic Drugs: DNA Damage and Repair in Glioblastoma. *Cancers*. 2017 May 26;9(6):57.
311. Perazzoli G, Prados J, Ortiz R, Caba O, Cabeza L, Berdasco M, et al. Temozolomide Resistance in Glioblastoma Cell Lines: Implication of MGMT, MMR, P-Glycoprotein and CD133 Expression. Alonso MM, editor. *PLOS ONE*. 2015 Oct 8;10(10):e0140131.
312. Ropolo M, Daga A, Griffero F, Foresta M, Casartelli G, Zunino A, et al. Comparative Analysis of DNA Repair in Stem and Nonstem Glioma Cell Cultures. *Mol Cancer Res*. 2009 Mar 1;7(3):383–92.
313. Johannessen TCA, Bjerkvig R, Tysnes BB. DNA repair and cancer stem-like cells – Potential partners in glioma drug resistance? *Cancer Treat Rev*. 2008 Oct;34(6):558–67.
314. Osuka S, Van Meir EG. Overcoming therapeutic resistance in glioblastoma: the way forward. *J Clin Invest*. 2017 Feb 1;127(2):415–26.
315. Mukherjee B, McEllin B, Camacho CV, Tomimatsu N, Sirasanagandala S, Nannepaga S, et al. EGFRvIII and DNA Double-Strand Break Repair: A Molecular Mechanism for Radioresistance in Glioblastoma. *Cancer Res*. 2009 May 15;69(10):4252–9.
316. Fillingham J, Keogh MC, Krogan NJ. γ H2AX and its role in DNA double-strand break repair This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled 27th International West Coast Chromatin and Chromosome Conference, and has undergone the Journal's usual peer review process. *Biochem Cell Biol*. 2006 Aug;84(4):568–77.
317. Furuta T, Takemura H, Liao ZY, Aune GJ, Redon C, Sedelnikova OA, et al. Phosphorylation of Histone H2AX and Activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in Response to Replication-dependent DNA Double-strand Breaks Induced by Mammalian DNA Topoisomerase I Cleavage Complexes. *J Biol Chem*. 2003 May;278(22):20303–12.
318. Lukas C, Bartkova J, Latella L, Falck J, Mailand N, Schroeder T, et al. DNA damage-activated kinase Chk2 is independent of proliferation or differentiation yet correlates with tissue biology. *Cancer Res*. 2001 Jul 1;61(13):4990–3.

319. Bartek J, Lukas J. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell*. 2003 May;3(5):421–9.
320. Eich M, Roos WP, Nikolova T, Kaina B. Contribution of ATM and ATR to the Resistance of Glioblastoma and Malignant Melanoma Cells to the Methylating Anticancer Drug Temozolomide. *Mol Cancer Ther*. 2013 Nov 1;12(11):2529–40.
321. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Mar;9(3):231–41.
322. Karunakaran D, Joseph J, Kumar TRS. Cell growth regulation. *Adv Exp Med Biol*. 2007;595:245–68.
323. Fulda S. Tumor resistance to apoptosis. *Int J Cancer*. 2009 Feb 1;124(3):511–5.
324. Guo G, Sun Y, Hong R, Xiong J, Lu Y, Liu Y, et al. IKBKE enhances TMZ-chemoresistance through upregulation of MGMT expression in glioblastoma. *Clin Transl Oncol*. 2020 Aug;22(8):1252–62.
325. Ha W, Sevim-Nalkiran H, Zaman AM, Matsuda K, Khasraw M, Nowak AK, et al. Ibudilast sensitizes glioblastoma to temozolomide by targeting Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF). *Sci Rep*. 2019 Feb 27;9(1):2905.
326. Qin N, Han F, Li L, Ge Y, Lin W, Wang J, et al. Deubiquitinating enzyme 4 facilitates chemoresistance in glioblastoma by inhibiting P53 activity. *Oncol Lett* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2023 Feb 21]; Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2018.9654>
327. Wang JJ, Lei KF, Han F. Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018 Jun;22(12):3855–64.
328. Armand EJ, Li J, Xie F, Luo C, Mukamel EA. Single-Cell Sequencing of Brain Cell Transcriptomes and Epigenomes. *Neuron*. 2021 Jan;109(1):11–26.
329. Wang JYJ, Edelmann W. Mismatch repair proteins as sensors of alkylation DNA damage. *Cancer Cell*. 2006 Jun;9(6):417–8.
330. Rivera AL, Pelloski CE, Gilbert MR, Colman H, De La Cruz C, Sulman EP, et al. MGMT promoter methylation is predictive of response to radiotherapy and prognostic in the absence of adjuvant alkylating chemotherapy for glioblastoma. *Neuro-Oncol*. 2010 Feb 1;12(2):116–21.
331. Nagel ZD, Kitange GJ, Gupta SK, Joughin BA, Chaim IA, Mazzucato P, et al. DNA Repair Capacity in Multiple Pathways Predicts Chemoresistance in

Glioblastoma Multiforme. *Cancer Res.* 2017 Jan 1;77(1):198–206.

332. Hunter C, Smith R, Cahill DP, Stephens P, Stevens C, Teague J, et al. A Hypermutation Phenotype and Somatic *MSH6* Mutations in Recurrent Human Malignant Gliomas after Alkylator Chemotherapy. *Cancer Res.* 2006 Apr 15;66(8):3987–91.

333. McFaline-Figueroa JL, Braun CJ, Stanciu M, Nagel ZD, Mazzucato P, Sangaraju D, et al. Minor Changes in Expression of the Mismatch Repair Protein MSH2 Exert a Major Impact on Glioblastoma Response to Temozolomide. *Cancer Res.* 2015 Aug 1;75(15):3127–38.

334. Cheng CL, Johnson SP, Keir ST, Quinn JA, Ali-Osman F, Szabo C, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibition reverses temozolomide resistance in a DNA mismatch repair–deficient malignant glioma xenograft. *Mol Cancer Ther.* 2005 Sep 1;4(9):1364–8.

335. Agnihotri S, Gajadhar AS, Ternamian C, Gorlia T, Diefes KL, Mischel PS, et al. Alkylpurine–DNA–N-glycosylase confers resistance to temozolomide in xenograft models of glioblastoma multiforme and is associated with poor survival in patients. *J Clin Invest.* 2012 Jan 3;122(1):253–66.

336. Caporali S, Falcinelli S, Starace G, Russo MT, Bonmassar E, Jiricny J, et al. DNA damage induced by temozolomide signals to both ATM and ATR: role of the mismatch repair system. 2004 [cited 2023 Feb 21]; Available from: <https://www.zora.uzh.ch/id/eprint/31218>

337. Tomiyama A, Kobayashi T, Mori K, Ichimura K. Protein Phosphatases—A Touchy Enemy in the Battle Against Glioblastomas: A Review. *Cancers.* 2019 Feb 19;11(2):241.

338. Brennan CW, Verhaak RGW, McKenna A, Campos B, Nounshmehr H, Salama SR, et al. The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. *Cell.* 2013 Oct;155(2):462–77.

339. Aasland D, Götzinger L, Hauck L, Berte N, Meyer J, Effenberger M, et al. Temozolomide Induces Senescence and Repression of DNA Repair Pathways in Glioblastoma Cells via Activation of ATR–CHK1, p21, and NF-κB. *Cancer Res.* 2019 Jan 1;79(1):99–113.

340. Wade M, Li YC, Wahl GM. MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2013 Feb;13(2):83–96.

341. Zhang Y, Dube C, Gibert M, Cruickshanks N, Wang B, Coughlan M, et al. The p53 Pathway in Glioblastoma. *Cancers.* 2018 Sep 1;10(9):297.

342. Silva JL, Cino EA, Soares IN, Ferreira VF, A. P. de Oliveira G. Targeting the Prion-like Aggregation of Mutant p53 to Combat Cancer. *Acc Chem Res.* 2018 Jan 16;51(1):181–90.
343. Barak Y, Gottlieb E, Juven-Gershon T, Oren M. Regulation of mdm2 expression by p53: alternative promoters produce transcripts with nonidentical translation potential. *Genes Dev.* 1994 Aug 1;8(15):1739–49.
344. Venkatesan S, Lamfers ML, Dirven CM, Leenstra S. Genetic biomarkers of drug response for small-molecule therapeutics targeting the RTK/Ras/PI3K, p53 or Rb pathway in glioblastoma. *CNS Oncol.* 2016 Apr;5(2):77–90.
345. Warfel NA, El-Deiry WS. p21WAF1 and tumourigenesis: 20 years after. *Curr Opin Oncol.* 2013 Jan;25(1):52–8.
346. Sato A, Sunayama J, Matsuda K ichiro, Seino S, Suzuki K, Watanabe E, et al. MEK-ERK Signaling Dictates DNA-Repair Gene MGMT Expression and Temozolomide Resistance of Stem-Like Glioblastoma Cells via the MDM2-p53 Axis. *Stem Cells.* 2011 Dec 1;29(12):1942–51.
347. Aubrey BJ, Kelly GL, Janic A, Herold MJ, Strasser A. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death Differ.* 2018 Jan;25(1):104–13.
348. Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci.* 2003 Oct 15;116(20):4077–85.
349. Tirapelli DP da C, Lustosa IL, Menezes SB, Franco IM, Rodrigues AR, Peria FM, et al. High expression of XIAP and Bcl-2 may inhibit programmed cell death in glioblastomas. *Arq Neuropsiquiatr.* 2017 Dec;75(12):875–80.
350. Stehlik C, de Martin R, Kumabashiri I, Schmid JA, Binder BR, Lipp J. Nuclear Factor (NF)- κ B-regulated X-chromosome-linked iap Gene Expression Protects Endothelial Cells from Tumor Necrosis Factor α -induced Apoptosis. *J Exp Med.* 1998 Jul 1;188(1):211–6.
351. Nakada M, Kita D, Teng L, Pyko IV, Watanabe T, Hayashi Y, et al. Receptor Tyrosine Kinases: Principles and Functions in Glioma Invasion. In: Barańska J, editor. *Glioma Signaling* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2020 [cited 2023 Feb 21]. p. 151–78. (Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 1202). Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-30651-9_8
352. Tomiyama A, Ichimura K. Signal transduction pathways and resistance to targeted therapies in glioma. *Semin Cancer Biol.* 2019 Oct;58:118–29.
353. Sugawa N, Ekstrand AJ, James CD, Collins VP. Identical splicing of

aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas. *Proc Natl Acad Sci*. 1990 Nov;87(21):8602–6.

354. Guo G, Gong K, Wohlfeld B, Hatanpaa KJ, Zhao D, Habib AA. Ligand-Independent EGFR Signaling. *Cancer Res*. 2015 Sep 1;75(17):3436–41.

355. Ozawa T, Brennan CW, Wang L, Squatrito M, Sasayama T, Nakada M, et al. *PDGFRA* gene rearrangements are frequent genetic events in *PDGFRA* - amplified glioblastomas. *Genes Dev*. 2010 Oct 1;24(19):2205–18.

356. Day BW, Stringer BW, Boyd AW. Eph receptors as therapeutic targets in glioblastoma. *Br J Cancer*. 2014 Sep;111(7):1255–61.

357. Vehlow A, Klapproth E, Jin S, Hannen R, Hauswald M, Bartsch JW, et al. Interaction of Discoidin Domain Receptor 1 with a 14-3-3-Bec1-Akt1 Complex Modulates Glioblastoma Therapy Sensitivity. *Cell Rep*. 2019 Mar;26(13):3672-3683.e7.

358. Abounader R, Laterra J. Scatter factor/hepatocyte growth factor in brain tumor growth and angiogenesis. *Neuro-Oncol*. 2005 Oct 1;7(4):436–51.

359. Jimenez-Pascual A, A. Siebzehnrubl F. Fibroblast Growth Factor Receptor Functions in Glioblastoma. *Cells*. 2019 Jul 13;8(7):715.

360. Sadahiro H, Kang KD, Gibson JT, Minata M, Yu H, Shi J, et al. Activation of the Receptor Tyrosine Kinase AXL Regulates the Immune Microenvironment in Glioblastoma. *Cancer Res*. 2018 Jun 1;78(11):3002–13.

361. Roskoski R. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol Res*. 2014 Jan;79:34–74.

362. Harder BG, Peng S, Sereduk CP, Sodoma AM, Kitange GJ, Loftus JC, et al. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase by PX-866 suppresses temozolomide-induced autophagy and promotes apoptosis in glioblastoma cells. *Mol Med*. 2019 Dec;25(1):49.

363. Pathania S, Pentikäinen OT, Singh PK. A holistic view on c-Kit in cancer: Structure, signaling, pathophysiology and its inhibitors. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer*. 2021 Dec;1876(2):188631.

364. Gomes AL, Reis-Filho JS, Lopes JM, Martinho O, Lambros MBK, Martins A, et al. Molecular Alterations of *KIT* Oncogene in Gliomas. *Anal Cell Pathol*. 2007 Jan 1;29(5):399–408.

365. Beauchamp RL, Erdin S, Witt L, Jordan JT, Plotkin SR, Gusella JF, et al. mTOR kinase inhibition disrupts neuregulin 1-ERBB3 autocrine signaling and sensitizes NF2-deficient meningioma cellular models to IGF1R inhibition. *J Biol Chem*. 2021 Jan;296:100157.
366. Botchkareva NV, Khlgatian M, Jack Longley B, Botchkarev VA, Gilchrest BA. SCF/c- kit signaling is required for cyclic regeneration of the hair pigmentation unit. *FASEB J*. 2001 Mar;15(3):645–58.
367. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*. 2017 Mar;168(6):960–76.
368. Sithanandam G, Anderson LM. The ERBB3 receptor in cancer and cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther*. 2008 Jul;15(7):413–48.
369. Sibilina M, Kroismayr R, Lichtenberger BM, Natarajan A, Hecking M, Holcmann M. The epidermal growth factor receptor: from development to tumorigenesis. *Differentiation*. 2007 Nov;75(9):770–87.
370. Kiavue N, Cabel L, Melaabi S, Bataillon G, Callens C, Lerebours F, et al. ERBB3 mutations in cancer: biological aspects, prevalence and therapeutics. *Oncogene*. 2020 Jan 16;39(3):487–502.
371. Clark PA, Iida M, Treisman DM, Kalluri H, Ezhilan S, Zorniak M, et al. Activation of Multiple ERBB Family Receptors Mediates Glioblastoma Cancer Stem-like Cell Resistance to EGFR-Targeted Inhibition. *Neoplasia*. 2012 May;14(5):420-IN13.
372. Stankov K, Popovic S, Mikov M. C-KIT Signaling in Cancer Treatment. *Curr Pharm Des*. 2014 May 31;20(17):2849–80.
373. Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer*. 2011 Nov;11(11):761–74.
374. Lavoie H, Therrien M. Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015 May;16(5):281–98.
375. Shaul YD, Seger R. The MEK/ERK cascade: From signaling specificity to diverse functions. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. 2007 Aug;1773(8):1213–26.
376. Horbinski C, Hamilton RL, Nikiforov Y, Pollack IF. Association of molecular alterations, including BRAF, with biology and outcome in pilocytic astrocytomas. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2010 May;119(5):641–9.

377. Yaeger R, Corcoran RB. Targeting Alterations in the RAF–MEK Pathway. *Cancer Discov.* 2019 Mar 1;9(3):329–41.
378. Lobbous, Bernstock, Coffee, Friedman, Metrock, Chagoya, et al. An Update on Neurofibromatosis Type 1-Associated Gliomas. *Cancers.* 2020 Jan 1;12(1):114.
379. Fruman DA, Chiu H, Hopkins BD, Bagrodia S, Cantley LC, Abraham RT. The PI3K Pathway in Human Disease. *Cell.* 2017 Aug;170(4):605–35.
380. Manning BD, Toker A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell.* 2017 Apr;169(3):381–405.
381. Huang J, Manning BD. The TSC1–TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *Biochem J.* 2008 Jun 1;412(2):179–90.
382. Masui K, Cavenee WK, Mischel PS. mTORC2 in the center of cancer metabolic reprogramming. *Trends Endocrinol Metab.* 2014 Jul;25(7):364–73.
383. Fan QW, Cheng C, Knight ZA, Haas-Kogan D, Stokoe D, James CD, et al. EGFR Signals to mTOR Through PKC and Independently of Akt in Glioma. *Sci Signal* [Internet]. 2009 Jan 27 [cited 2023 Feb 23];2(55). Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/scisignal.2000014>
384. Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet.* 2006 Aug;7(8):606–19.
385. Torres García J. FOSFOLÍPIDOS: PROPIEDADES Y EFECTOS SOBRE LA SALUD. *Nutr Hosp.* 2015 Jan 1;(1):76–83.
386. Irvine R. Inositol phospholipids: Translocation, translocation, translocation *Curr Biol.* 1998 Jul;8(16):R557–9.
387. Poccia D, Larijani B. Phosphatidylinositol metabolism and membrane fusion. *Biochem J.* 2009 Mar 1;418(2):233–46.
388. Parthasarathy R, Eisenberg F. The inositol phospholipids: a stereochemical view of biological activity. *Biochem J.* 1986 Apr 15;235(2):313–22.
389. Tanaka S, Batchelor TT, Iafrate AJ, Dias-Santagata D, Borger DR, Ellisen LW, et al. PIK3CA activating mutations are associated with more disseminated disease at presentation and earlier recurrence in glioblastoma. *Acta Neuropathol Commun.* 2019 Dec;7(1):66.

390. Mirzaa G, Graham JM, Keppler-Noreuil K. PIK3CA-Related Overgrowth Spectrum. In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Gripp KW, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [cited 2022 Jun 27]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK153722/>
391. Gozzelino L, Kochlamazashvili G, Baldassari S, Mackintosh AI, Licchetta L, Iovino E, et al. Defective lipid signalling caused by mutations in *PIK3C2B* underlies focal epilepsy. *Brain*. 2022 Jul 29;145(7):2313–31.
392. Gross C, Bassell GJ. Neuron-specific regulation of class I PI3K catalytic subunits and their dysfunction in brain disorders. *Front Mol Neurosci* [Internet]. 2014 [cited 2022 Aug 7];7. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnmol.2014.00012/abstract>
393. Maini J, Ghasemi M, Yandhuri D, Thakur SS, Brahmachari V. Human PRE-PIK3C2B, an intronic cis-element with dual function of activation and repression. *Biochim Biophys Acta BBA - Gene Regul Mech*. 2017 Feb;1860(2):196–204.
394. Bengani H, Mendiratta S, Maini J, Vasanthi D, Sultana H, Ghasemi M, et al. Identification and Validation of a Putative Polycomb Responsive Element in the Human Genome. Feil R, editor. *PLoS ONE*. 2013 Jun 21;8(6):e67217.
395. Katso RM, Pardo OE, Palamidessi A, Franz CM, Marinov M, De Laurentiis A, et al. Phosphoinositide 3-Kinase C2 β Regulates Cytoskeletal Organization and Cell Migration via Rac-dependent Mechanisms. Assoian R, editor. *Mol Biol Cell*. 2006 Sep;17(9):3729–44.
396. Maffucci T, Falasca M. New insight into the intracellular roles of class II phosphoinositide 3-kinases. *Biochem Soc Trans*. 2014 Oct 1;42(5):1378–82.
397. Aung KT, Yoshioka K, Aki S, Ishimaru K, Takuwa N, Takuwa Y. The class II phosphoinositide 3-kinases PI3K-C2 α and PI3K-C2 β differentially regulate clathrin-dependent pinocytosis in human vascular endothelial cells. *J Physiol Sci*. 2019 Mar;69(2):263–80.
398. Gallia GL, Rand V, Siu IM, Eberhart CG, James CD, Marie SKN, et al. *PIK3CA* Gene Mutations in Pediatric and Adult Glioblastoma Multiforme. *Mol Cancer Res*. 2006 Oct 1;4(10):709–14.
399. Knobbe CB, Reifenberger G. Genetic Alterations and Aberrant Expression of Genes Related to the Phosphatidylinositol-3'-Kinase/Protein Kinase B (Akt) Signal Transduction Pathway in Glioblastomas. *Brain Pathol*. 2006 Apr 5;13(4):507–18.

400. Rao SK, Edwards J, Joshi AD, Siu IM, Riggins GJ. A survey of glioblastoma genomic amplifications and deletions. *J Neurooncol.* 2010 Jan;96(2):169–79.
401. Robinson G, Parker M, Kranenburg TA, Lu C, Chen X, Ding L, et al. Novel mutations target distinct subgroups of medulloblastoma. *Nature.* 2012 Aug;488(7409):43–8.
402. Wang C, Yang Y, Yin L, Wei N, Hong T, Sun Z, et al. Novel Potential Biomarkers Associated With Epithelial to Mesenchymal Transition and Bladder Cancer Prognosis Identified by Integrated Bioinformatic Analysis. *Front Oncol.* 2020 Jun 30;10:931.
403. Liu Z, Li X, Ma J, Li D, Ju H, Liu Y, et al. Integrative Analysis of the IQ Motif-Containing GTPase-Activating Protein Family Indicates That the IQGAP3-PIK3C2B Axis Promotes Invasion in Colon Cancer. *OncoTargets Ther.* 2020 Aug;Volume 13:8299–311.
404. Ma XL, Shen MN, Hu B, Wang BL, Yang WJ, Lv LH, et al. CD73 promotes hepatocellular carcinoma progression and metastasis via activating PI3K/AKT signaling by inducing Rap1-mediated membrane localization of P110 β and predicts poor prognosis. *J Hematol Oncol* *J Hematol Oncol.* 2019 Dec;12(1):37.
405. Liu Z, Sun C, Zhang Y, Ji Z, Yang G. Phosphatidylinositol 3-Kinase-C2 β Inhibits Cisplatin-Mediated Apoptosis via the Akt Pathway in Oesophageal Squamous Cell Carcinoma. *J Int Med Res.* 2011 Aug;39(4):1319–32.
406. Cisse O, Quraishi M, Gulluni F, Guffanti F, Mavrommati I, Suthanthirakumaran M, et al. Downregulation of class II phosphoinositide 3-kinase PI3K-C2 β delays cell division and potentiates the effect of docetaxel on cancer cell growth. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019 Dec;38(1):472.
407. Löw S, Vougioukas VI, Hielscher T, Schmidt U, Unterberg A, Halatsch ME. Pathogenetic pathways leading to glioblastoma multiforme: association between gene expressions and resistance to erlotinib. *Anticancer Res.* 2008 Dec;28(6A):3729–32.
408. Duggan MR, Weaver M, Khalili K. PAM (PIK3/AKT/mTOR) signaling in glia: potential contributions to brain tumors in aging. *Aging.* 2021 Jan 15;13(1):1510–27.
409. Fan QW, Cheng C, Hackett C, Feldman M, Houseman BT, Nicolaidis T, et al. Akt and Autophagy Cooperate to Promote Survival of Drug-Resistant Glioma. *Sci Signal [Internet].* 2010 Nov 9 [cited 2022 Aug 7];3(147). Available from:

<https://www.science.org/doi/10.1126/scisignal.2001017>

410. Kita D, Yonekawa Y, Weller M, Ohgaki H. PIK3CA alterations in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2007 Feb 6;113(3):295–302.

411. Liggett LA, DeGregori J. Changing mutational and adaptive landscapes and the genesis of cancer. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer*. 2017 Apr;1867(2):84–94.

412. Immanuel SRC, Ghanate AD, Parmar DS, Marriage F, Panchagnula V, Day PJ, et al. Integrative analysis of rewired central metabolism in temozolomide resistant cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Jan;495(2):2010–6.

413. Zhang LH, Yin AA, Cheng JX, Huang HY, Li XM, Zhang YQ, et al. TRIM24 promotes glioma progression and enhances chemoresistance through activation of the PI3K/Akt signaling pathway. *Oncogene*. 2015 Jan 29;34(5):600–10.

414. Bao ZS, Chen HM, Yang MY, Zhang CB, Yu K, Ye WL, et al. RNA-seq of 272 gliomas revealed a novel, recurrent *PTPRZ1-MET* fusion transcript in secondary glioblastomas. *Genome Res*. 2014 Nov;24(11):1765–73.

415. Omuro A, Beal K, McNeill K, Young RJ, Thomas A, Lin X, et al. Multicenter Phase IB Trial of Carboxyamidotriazole Orotate and Temozolomide for Recurrent and Newly Diagnosed Glioblastoma and Other Anaplastic Gliomas. *J Clin Oncol*. 2018 Jun 10;36(17):1702–9.

416. Paul-Samojedny M, Pudełko A, Kowalczyk M, Fila-Daniłow A, Suchanek-Raif R, Borkowska P, et al. Combination Therapy with AKT3 and PI3KCA siRNA Enhances the Antitumor Effect of Temozolomide and Carmustine in T98G Glioblastoma Multiforme Cells. *BioDrugs*. 2016 Apr;30(2):129–44.

417. Saeed MEM, Kadioglu O, Greten HJ, Yildirim A, Mayr K, Wenz F, et al. Drug repurposing using transcriptome sequencing and virtual drug screening in a patient with glioblastoma. *Invest New Drugs*. 2021 Jun;39(3):670–85.

418. Wang P, Ye JA, Hou CX, Zhou D, Zhan SQ. Combination of lentivirus-mediated silencing of PPM1D and temozolomide chemotherapy eradicates malignant glioma through cell apoptosis and cell cycle arrest. *Oncol Rep*. 2016 Nov;36(5):2544–52.

419. Pinweha P, Rattanapornsompong K, Charoensawan V, Jitrapakdee S. MicroRNAs and oncogenic transcriptional regulatory networks controlling metabolic reprogramming in cancers. *Comput Struct Biotechnol J*. 2016;14:223–33.

420. Chen PH, Cheng CH, Shih CM, Ho KH, Lin CW, Lee CC, et al. The Inhibition of microRNA-128 on IGF-1-Activating mTOR Signaling Involves in Temozolomide-Induced Glioma Cell Apoptotic Death. Jiang BH, editor. PLOS ONE. 2016 Nov 28;11(11):e0167096.
421. Dong H, Luo L, Hong S, Siu H, Xiao Y, Jin L, et al. Integrated analysis of mutations, miRNA and mRNA expression in glioblastoma. BMC Syst Biol. 2010 Dec;4(1):163.
422. Rahane CS, Kutzner A, Heese K. A cancer tissue-specific FAM72 expression profile defines a novel glioblastoma multiform (GBM) gene-mutation signature. J Neurooncol. 2019 Jan;141(1):57–70.
423. Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. The JAK/STAT signaling pathway. J Cell Sci. 2004 Mar 15;117(8):1281–3.
424. Ceresa BP, Horvath CM, Pessin JE. Signal Transducer and Activator of Transcription-3 Serine Phosphorylation by Insulin Is Mediated by a Ras/Raf/MEK-Dependent Pathway*. Endocrinology. 1997 Oct 1;138(10):4131–7.
425. Hammarén HM, Virtanen AT, Raivola J, Silvennoinen O. The regulation of JAKs in cytokine signaling and its breakdown in disease. Cytokine. 2019 Jun;118:48–63.
426. Sang Y, Li Y, Song L, Alvarez AA, Zhang W, Lv D, et al. TRIM59 Promotes Gliomagenesis by Inhibiting TC45 Dephosphorylation of STAT3. Cancer Res. 2018 Apr 1;78(7):1792–804.
427. Kohsaka S, Wang L, Yachi K, Mahabir R, Narita T, Itoh T, et al. STAT3 Inhibition Overcomes Temozolomide Resistance in Glioblastoma by Downregulating MGMT Expression. Mol Cancer Ther. 2012 Jun 1;11(6):1289–99.
428. Hulley SB, editor. Designing clinical research. 4th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
429. Hernández-Avila M, Garrido F, Salazar-Martínez E. [Biases in epidemiological studies]. Salud Publica Mex. 2000;42(5):438–46.
430. Gómez-Gómez M, Danglot-Banck C, Huerta Alvarado SG, García de la Torre G. El estudio de casos y controles: su diseño, análisis en interpretación, en investigación clínica. Rev Mex Pediatr. 2003;70(5):257–63.
431. Schoenbach VJ, Schildkraut J, Rosamond W. Precisión. 2004;287–326.
432. Derecho de Autor Regional · DAR [Internet]. [cited 2016 Jul 27]. Available from:

http://www.cerlalc.org/derechoenlinea/dar/leyes_reglamentos/Colombia/Dec_andina_351.htm

433. Universidad CES. Reglamento de propiedad intelectual. 2010.
434. Citar, parafrasear y resumir [Internet]. [cited 2016 Jul 27]. Available from: http://centrodeescritura.javerianacali.edu.co/index.php?option=com_content&view=article&id=161:citar-parafrasear-y-resumir&catid=42:durante-la-escritura&Itemid=66
435. Gutmann DH, Ferner RE, Listernick RH, Korf BR, Wolters PL, Johnson KJ. Neurofibromatosis type 1. *Nat Rev Dis Primer*. 2017 Feb 23;3(1):17004.
436. Ossa CA, Molina G, Cock-Rada AM. Síndrome de Li-Fraumeni. *Biomédica*. 2016 May 23;36(2):182.
437. Garton ALA, Kinslow CJ, Rae AI, Mehta A, Pannullo SC, Magge RS, et al. Extent of resection, molecular signature, and survival in 1p19q-codeleted gliomas. *J Neurosurg*. 2021 May;134(5):1357–67.
438. Cost-effectiveness of temozolomide for the treatment of newly diagnosed glioblastoma multiforme. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2017 Sep 9]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bdigital.ces.edu.co:2443/pubmed/19527095>
439. Brown NF, Ottaviani D, Tazare J, Gregson J, Kitchen N, Brandner S, et al. Survival Outcomes and Prognostic Factors in Glioblastoma. *Cancers*. 2022 Jun 28;14(13):3161.
440. Labussiere M, Idbaih A, Wang XW, Marie Y, Boisselier B, Falet C, et al. All the 1p19q codeleted gliomas are mutated on IDH1 or IDH2. *Neurology*. 2010 Jun 8;74(23):1886–90.
441. Dumas-Duport C. Histological grading of gliomas. *Curr Opin Neurol Neurosurg*. 1992 Dec;5(6):924–31.
442. Soomro SH, Ting LR, Qing YY, Ren M. Molecular biology of glioblastoma: Classification and mutational locations. *JPMA J Pak Med Assoc*. 2017 Sep;67(9):1410–4.
443. Lee DH, Ryu HW, Won HR, Kwon SH. Advances in epigenetic glioblastoma therapy. *Oncotarget* [Internet]. 2017 Mar 14 [cited 2018 Sep 21];8(11). Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/14612>
444. Komori T. Grading of adult diffuse gliomas according to the 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System. *Lab Invest*. 2022

Feb;102(2):126–33.

445. Roberts DW, Valdés PA, Harris BT, Hartov A, Fan X, Ji S, et al. Glioblastoma Multiforme Treatment with Clinical Trials for Surgical Resection (Aminolevulinic Acid). *Neurosurg Clin N Am*. 2012 Jul;23(3):371–7.

446. Becker KP, Yu J. Status quo--standard-of-care medical and radiation therapy for glioblastoma. *Cancer J Sudbury Mass*. 2012 Feb;18(1):12–9.

447. Van Den Bent MJ, Bromberg JEC, Buckner J. Low-grade and anaplastic oligodendroglioma. In: *Handbook of Clinical Neurology* [Internet]. Elsevier; 2016 [cited 2022 Oct 15]. p. 361–80. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128029978000220>

448. Indraccolo S, Lombardi G, Fassan M, Pasqualini L, Giunco S, Marcato R, et al. Genetic, Epigenetic, and Immunologic Profiling of MMR-Deficient Relapsed Glioblastoma. *Clin Cancer Res*. 2019 Mar 15;25(6):1828–37.

449. Shen W, Hu JA, Zheng JS. Mechanism of temozolomide-induced antitumour effects on glioma cells. *J Int Med Res*. 2014 Feb;42(1):164–72.

450. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, et al. *MGMT* Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005 Mar 10;352(10):997–1003.

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

452. Binabaj MM, Bahrami A, ShahidSales S, Joodi M, Joudi Mashhad M, Hassanian SM, et al. The prognostic value of *MGMT* promoter methylation in glioblastoma: A meta-analysis of clinical trials. *J Cell Physiol*. 2018 Jan;233(1):378–86.

453. Margaria JP, Ratto E, Gozzelino L, Li H, Hirsch E. Class II PI3Ks at the Intersection between Signal Transduction and Membrane Trafficking. *Biomolecules*. 2019 Mar 15;9(3):104.

454. Yang RR, Li KKW, Zhang ZY, Chan AKY, Wang WW, Chan DTM, et al. Mismatch repair proteins PMS2 and MLH1 can further refine molecular stratification of IDH-mutant lower grade astrocytomas. *Clin Neurol Neurosurg*. 2021 Sep;208:106882.

455. Stark AM, Doukas A, Hugo HH, Hedderich J, Hattermann K, Maximilian Mehdorn H, et al. Expression of DNA mismatch repair proteins MLH1, MSH2, and MSH6 in recurrent glioblastoma. *Neurol Res*. 2015 Feb;37(2):95–105.

456. Xu B, Huo Z, Huang H, Ji W, Bian Z, Jiao J, et al. The expression and prognostic value of the epidermal growth factor receptor family in glioma. *BMC Cancer*. 2021 Dec;21(1):451.
457. Clínica Internacional San Borja. Lima, Perú. Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas (UPC), Facultad de Medicina. Lima, Perú. Médico Oncólogo, Maestría en Medicina, Aldecoa F, Ávila J, Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas (UPC), Facultad de Medicina. Lima, Perú. Médico cirujano, Coordinador de Línea de Estructura y Función. La vía canónica PI3K/AKT/mTOR y sus alteraciones en cáncer. *Horiz Méd Lima*. 2021 Dec 30;21(4):e1547.
458. Clínica Internacional San Borja. Lima, Perú. Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas (UPC), Facultad de Medicina. Lima, Perú. Médico Oncólogo, Maestría en Medicina, Aldecoa F, Ávila J, Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas (UPC), Facultad de Medicina. Lima, Perú. Médico cirujano, Coordinador de Línea de Estructura y Función. La vía canónica PI3K/AKT/mTOR y sus alteraciones en cáncer. *Horiz Méd Lima*. 2021 Dec 30;21(4):e1547.
459. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*. 2017 Mar;168(6):960–76.
460. Margaria JP, Ratto E, Gozzelino L, Li H, Hirsch E. Class II PI3Ks at the Intersection between Signal Transduction and Membrane Trafficking. *Biomolecules*. 2019 Mar 15;9(3):104.
461. Rao SK, Edwards J, Joshi AD, Siu IM, Riggins GJ. A survey of glioblastoma genomic amplifications and deletions. *J Neurooncol*. 2010 Jan;96(2):169–79.
462. Liu Z, Sun C, Zhang Y, Ji Z, Yang G. Phosphatidylinositol 3-Kinase-C2 β Inhibits Cisplatin-Mediated Apoptosis via the Akt Pathway in Oesophageal Squamous Cell Carcinoma. *J Int Med Res*. 2011 Aug;39(4):1319–32.
463. Ortiz R, Perazzoli G, Cabeza L, Jiménez-Luna C, Luque R, Prados J, et al. Temozolomide: An Updated Overview of Resistance Mechanisms, Nanotechnology Advances and Clinical Applications. *Curr Neuropharmacol*. 2021 Apr;19(4):513–37.
464. Felsberg J, Thon N, Eigenbrod S, Hentschel B, Sabel MC, Westphal M, et al. Promoter methylation and expression of MGMT and the DNA mismatch repair genes MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2 in paired primary and recurrent glioblastomas. *Int J Cancer*. 2011 Aug 1;129(3):659–70.
465. Felsberg J, Rapp M, Loeser S, Fimmers R, Stummer W, Goepfert M, et al. Prognostic Significance of Molecular Markers and Extent of Resection in Primary

Glioblastoma Patients. Clin Cancer Res. 2009 Nov 1;15(21):6683–93.

466. Zhang P, Wang H, Chen Y, Lodhi AF, Sun C, Sun F, et al. DR5 related autophagy can promote apoptosis in gliomas after irradiation. Biochem Biophys Res Commun. 2020 Feb;522(4):910–6.

14 PRODUCTOS

14.1 Artículos publicados relacionados con la tesis

Revista de la Escuela de Ciencias de la Salud de la Universidad Pontificia Bolivariana,
Colombia / ISSN: 2357-6308 (En línea)

Medicina UPB

ARTÍCULO DE REVISIÓN

Ventajas de la secuenciación de próxima generación sobre la hibridación fluorescente *in situ* para detectar la codeleción 1p/19q en oligodendrogliomas

Advantages of next generation sequencing over fluorescent *in situ* hybridization to detect 1p/19q codeletion in oligodendroglioma / Vantagens do sequenciamento de próxima geração sobre a hibridação fluorescente *in situ* para detectar codelecção 1p/19q em oligodendrogliomas

Fecha de recibido:

21 de junio de 2022.

Fecha de aprobación:

3 de noviembre de 2022.

León Darío Ortiz Gómez^{1,2,3}, David Andrés Galvis Pareja², Ronald Guillermo Peláez Sánchez¹, Carlos Jaime Yepes^{1,3}, Piedad Matilde Agudelo Flórez¹.

RESUMEN

El perfil molecular de los gliomas permite garantizar la precisión del diagnóstico, informar el pronóstico e identificar opciones de tratamiento. Esta revisión tiene como objetivo exponer que con la secuenciación de próxima generación (NSG) el diagnóstico de los pacientes con oligodendrogliomas puede ser más exacto. Además, con un dispositivo de diagnóstico *in vitro*, basado en la NSG (F1CDx), en el que se utilizan los bloques de parafina de gliomas para analizar hasta 395 genes relacionados con cáncer (incluido IDH 1 y 2), se puede también informar la pérdida de la totalidad del brazo corto del cromosoma 1 y del brazo largo del cromosoma 19 (codeleción 1p/19q), a diferencia de la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) que detecta desde la más mínima deleción, lo cual los hace sensibles pero no específicos ya que el FISH es incapaz de distinguir entre la pérdida de la totalidad del brazo del cromosoma y una deleción focal. Esta distinción es importante ya que la supervivencia es inferior en tumores con deleción parcial en relación con los oligodendrogliomas, que tienen por definición la pérdida total de ambos cromosomas. Se hace también alusión a otras plataformas genómicas como GliOSeq y GLIO-DNA panel, que pueden cumplir la misma función. En conclusión, la F1CDx puede determinar con precisión 1p/19q con una concordancia del 96.7% frente a FISH. Los casos en que el FISH dio positivo y no concordaban con F1CDx, era porque no se trataba de oligodendrogliomas. F1CDx también analiza todos los genes que permiten la aproximación más exacta al diagnóstico de oligodendroglioma.

Palabras clave: glioma; oligodendrogliomas del adulto; isocitrato deshidrogenasa

ABSTRACT

Molecular profiling of gliomas helps ensure diagnostic accuracy, inform prognosis, and identify treatment options. This review aims to show that with next generation sequencing (NGS) the diagnosis of patients with oligodendrogliomas can be more accurate. In addition, with an *in vitro* diagnostic device, based on NSG (F1CDx), in which glioma paraffin blocks are used to analyze up to 395 cancer-related genes (including IDH 1 and 2), it is also possible to report the loss of the entire short arm of chromosome 1 and the long arm of chromosome 19 (1p/19q codeletion), unlike fluorescence *in situ* hybridization (FISH) that detects even the slightest deletion, making them sensitive but not specific, as FISH is unable to distinguish between the loss of the entire arm of the chromosome and a focal deletion. This distinction is important since survival is lower in

Forma de citar este artículo:

Ortiz LD, Galvis DA, Peláez RG, Yepes CJ, Agudelo PM. Ventajas de la secuenciación de próxima generación sobre la hibridación fluorescente *in situ* para detectar la codeleción 1p/19q en oligodendrogliomas. Med UPB. 2023;42(1):85-95. DOI:10.18566/medupb.v42n1.a11

- 1 Escuela de graduados, Grupo de Ciencias Básicas, Universidad CES, Medellín, Colombia
- 2 Grupo Farmacodinamia, Universidad CES, Medellín, Colombia
- 3 Instituto de Cancerología, Clínica Las AméricasAUNA, Medellín, Colombia.

Dirección de correspondencia:

León Darío Ortiz Gómez. Correo electrónico: lortiz@uces.edu.co

Reporte de caso

Mutaciones en los genes PDGFRA, KIT y KDR en pacientes con glioblastoma se relacionan con un peor desenlace

Mutations in the PDGFRA, KIT, and KDR genes in patients with glioblastoma are associated with a worse outcome

León Darío Ortiz Gómez ¹ , Sara Vélez Gómez ² , Juliana María Martínez Garro ³ ,
Ronald Guillermo Peláez Sánchez ⁴ 

¹ Doctorado de Ciencias de la Salud, Escuela de Graduados, Universidad CES, Medellín, Colombia. Instituto de Cancerología, Clínica Las Américas-AUNA, Medellín, Colombia.

² Estudiante de Maestría en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias y Biotecnología, Universidad CES, Medellín, Colombia.

³ Grupo de Investigación Biología CES, Facultad de Ciencias y Biotecnología, Universidad CES, Medellín, Colombia.

⁴ Grupo de Investigación en Ciencias de la Vida y la Salud, Escuela de Graduados, Universidad CES, Medellín, Colombia.

Fecha correspondencia:

Recibido: octubre 16 de 2022.

Revisado: octubre 20 de 2022.

Aceptado: febrero 16 de 2023.

Forma de citar:

Ortiz-Gómez LD, Vélez-Gómez S, Martínez-Garro JM, Peláez-Sánchez GP. Mutaciones en los genes PDGFRA, KIT y KDR en pacientes con glioblastoma se relacionan con un peor desenlace. Rev Ces Med, 2023; 37(1): 151-162. <https://dx.doi.org/10.21615/cesmedicina.7095>

Open access

[© Derecho de autor](#)

[Licencia creative commons](#)

[Ética de publicaciones](#)

[Revisión por pares](#)

[Gestión por Open Journal System](#)

DOI: 10.21615/cesmedicina.7095

ISSN: 2215-9177

ISSN: 0120-8705

[Publica con nosotros](#)

Resumen

Introducción: existen varios Receptores Tirosina Quinasa que están involucrados en el desarrollo, crecimiento y progresión de las células tumorales, por ejemplo, en los glioblastomas se ha encontrado que por un posible desequilibrio de ligamiento los genes *PDGFRA*, *KIT* y *KDR*, ubicados en el brazo largo del cromosoma 4 (*4q11-q12*), podrían estar relacionados con la progresión de esta neoplasia. **Objetivo:** reportar dos casos clínicos de pacientes con diagnóstico de glioblastoma y mutaciones en los genes *PDGFRA*, *KIT*, *KDR*, y su relación con un peor desenlace. **Casos clínicos:** en este artículo se presenta el caso de dos pacientes con glioblastomas que presentan mutaciones en los genes anteriormente mencionados resultado de la secuenciación de un panel genético que evalúa 324 genes y 37 fusiones génicas y la progresión clínica acelerada durante el transcurso de la enfermedad. **Conclusión:** los cambios producidos en los glioblastomas por las mutaciones en los receptores tirosina quinasa a nivel biológico podrían describir una mayor capacidad proliferativa del tumor, lo que en el ámbito clínico se ha evidenciado como un peor pronóstico para el paciente, de ahí nace la necesidad de tener paneles genéticos que ayuden a identificar el perfil tumoral, e incentivar más estudios clínicos relacionados a fármacos que tengan como objetivo dichos receptores.

14.2 Artículos aceptados pero pendientes de publicar relacionados con la tesis

BIOMARCADORES GENÉTICOS EN SANGRE, UNA NUEVA HERRAMIENTA PARA EL DIAGNÓSTICO, PRONÓSTICO Y SUPERVIVENCIA EN PACIENTES CON GLIOMAS DE ALTO GRADO.

GENETICS BIOMARKERS IN BLOOD, A NEW TOOL FOR DIAGNOSIS, PROGNOSIS AND SURVIVAL IN PATIENTS WITH HIGH GRADE GLIOMAS.

León Darío Ortiz Gomez^{1,2,3}, Melisa Rincón Medina⁷, Piedad Matilde Agudelo Flórez⁴, Juan Carlos Arango⁶, Mauricio Camargo¹, Lina Marcela Barrera-Arenas^{1,5}.

¹Grupo Genética, Regeneración y Cáncer (GRC), Instituto de Biología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

²Doctorado Ciencias de la Salud, Escuela de Graduados. Universidad CES, Medellín, Colombia

³Instituto de Cancerología - Clínica Las Américas-AUNA, Medellín, Colombia.

⁴Escuela de graduados, Grupo Ciencias Básicas. Universidad CES, Medellín, Colombia.

⁵Grupo de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Corporación Universitaria Remington, Medellín, Colombia.

⁶Instituto de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

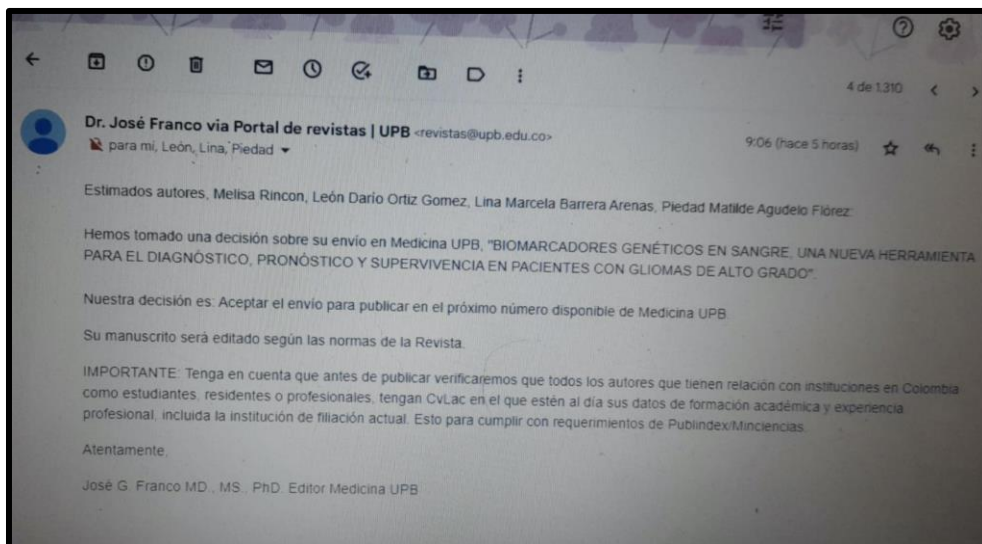
⁷Programa de Medicina, Facultad de Ciencias de la Salud, Corporación Universitaria Remington, Medellín, Colombia.

Lina Marcela Barrera. Correo electrónico: marcela.barrera@udea.edu.co

RESUMEN



La clasificación de los tumores del SNC se ha basado durante mucho tiempo en hallazgos histológicos respaldados por pruebas complementarias basadas en tejidos como la inmunohistoquímica. La quinta edición de la Clasificación de tumores del sistema nervioso central (SNC) de la OMS, publicada en 2021 (SNC5) incorpora numerosos cambios de marcadores moleculares con utilidad clínico-patológica que son importantes para la clasificación más precisa de las neoplasias del SNC. Es así como los gliomas difusos del adulto se definen como subtipos el astrocitoma mutado para *IDH*, el oligodendroglioma -mutado para *IDH* y con codelección 1p/19q y el Glioblastoma silvestre para *IDH*.

La mediana de supervivencia en los pacientes con glioblastoma es de sólo 14.6 meses, debido principalmente a la resistencia al protocolo de terapia más utilizado en el mundo, el cual involucra cirugía, radioterapia y quimioterapia con temozolamida, potente alquilante genotóxico.



14.3 Artículos sometidos relacionados con la tesis

Sometido a Cancers

	
Article	
Mutations in the <i>PIK3C2B</i>, <i>ERBB3</i>, <i>KIT</i>, and <i>MLH1</i> Genes and their Relationship with Resistance to Temozolomide in Patients with High-grade Gliomas	
León Darío Ortiz Gómez ^{1,2} , Heidy Johanna Contreras Martínez ³ , Piedad Agudelo-Florez ^{1,4} , David Andrés Galvis Pareja ³ , and Ronald Guillermo Peláez Sánchez ⁴	
¹ Doctoral Program in Health Sciences, Graduate School, CES University, Medellín, Colombia.	
² Cancer Institute, Las Americas-AUNA Clinic, Medellín, Colombia.	
³ Pharmaceutical Sciences Research Group (ICIF), CES University, Medellín, Colombia.	
⁴ Life and Health Sciences Research Group, Graduate School, CES University, Medellín, Colombia.	
*Correspondence: rpelaezp@ces.edu.co , phone: (57) (604) 4440555 Extension 1750	
Simple Summary: the present investigation aims to relate mutations in the <i>PIK3C2B</i> , <i>ERBB3</i> , <i>KIT</i> , and <i>MLH1</i> genes with mechanisms of resistance to temozolomide in patients with high-grade gliomas. With this study we intend to discover new mechanisms of resistance to temozolomide and provide an appropriate treatment to patients that prolongs their life span. This work can provide evidence to scientific community on the progressive acquisition of mutations in different genes of patients with high-grade gliomas that are related with drug resistance mechanisms and accelerated disease progression. Additionally, in the future, new therapeutic targets may be proposed for the generation of drugs that can control or cure this type of brain cancer.	
Abstract: Background. Patients' treatment with high-grade gliomas includes radiation therapy and temozolomide. However, some patients do not respond to temozolomide, because they have a methylation reversal mechanism through the enzyme O ⁶ -methylguanine-DNA-methyltransferase. This biomarker has been used as a prognostic factor in patients receiving treatment with temozolomide. However, not all patients respond in the same way, which suggests the existence of other genes involved in resistance to temozolomide. Materials and Methods. A group of 31 patients with high-grade gliomas was recruited, which were clinically, imaging, and pathologically characterized. The sequencing of 324 genes related to different types of cancer was performed to detect mutations. Subsequently, a statistical analysis was carried out to determine the mutated genes that were most related with resistance to treatment. Results. The genes related to second relapse of patients with high-grade glioma, after the use of temozolomide according to Stupp protocol and metronomic dose were <i>PIK3C2B</i> , <i>KIT</i> , <i>ERBB3</i> , and <i>MLH1</i> . Conclusions. considering the results obtained, we could suggest that the mutations in the four genes and the methylation of the gene promoter that codes for MGMT protein, could help to relate the clinical evolution of patients with high-grade gliomas and its response to treatment with temozolomide.	
Keywords: gliomas, temozolomide, resistance, genes, <i>PIK3C2B</i> , <i>ERBB3</i> , <i>KIT</i> , <i>MLH1</i> , MGMT.	
 Citation: To be added by editorial staff during production. Academic Editor: Firstname Last-name Received: date Revised: date Accepted: date Published: date  Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).	

Sometido a CES Medicina

Título: Clasificación molecular de los gliomas de alto grado mejora el diagnóstico, tratamiento y pronóstico de los pacientes.

Title: Molecular classification of high-grade gliomas improves the diagnosis, treatment, and prognosis of patients.

León Darío Ortiz Gómez^{1,2}, Sara Vélez Gómez³, Juliana María Martínez Garro⁴,
Ronald Guillermo Peláez Sánchez⁵

¹ Grupo de Investigación en Ciencias de la Vida y la Salud, Escuela de Graduados, Universidad CES, Medellín, Colombia.

²Instituto de Cancerología, Clínica Las Américas-AUNA, Medellín, Colombia.

³ Grupo de Investigación Biología CES, Facultad de Ciencias y Biotecnología, Universidad CES, Medellín, Colombia.

⁴ Grupo de Investigación Biología CES, Facultad de Ciencias y Biotecnología, Universidad CES, Medellín, Colombia.

⁵Grupo de Investigación en Ciencias de la Vida y la Salud, Escuela de Graduados, Universidad CES, Medellín, Colombia.

Autor para la correspondencia:

Leon Darío Ortiz Gómez, MD, MSc, cPhD.

Torre Medica Las Américas, Diagonal 75 B 2^a-80, Teléfono: (57)064-3459287.

Correo electrónico: lortiz@uces.edu.co

Sometido a Biomédica (comparto primer autor)

Survival Analysis of High-grade Glioma Patients and Associated Factors.

Análisis de supervivencia de pacientes con glioma de alto grado y factores asociados.

Lina Marcela Barrera^{1,*}, León Darío Ortiz^{1,3,4,*}, Hugo de Jesús Grisales², Mauricio Camargo¹.

¹ Grupo de investigaciones biomédicas, Facultad de ciencias de la salud, Corporación Universitaria Remington

² Grupo de Investigación Demografía y Salud, Facultad Nacional de Salud Pública, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

³ Instituto de Cancerología - Clínica Las Américas, Medellín, Colombia.

⁴ Doctorado Ciencias de la salud. Escuela de graduados Universidad CES.

*main author.

authors contribution:

Lina Marcela Barrera: sampling, standardization of the technique, experimental tests, statistical analysis, and analysis of results

León Darío Ortiz: logistics design for the clinical study of patients

Hugo de Jesús Grisales: statistical análisis.

Mauricio Camargo: conception and design of the study, supervision of the development of the work and analysis of the data.

all authors participated in writing the manuscript

14.4 Artículos para someter relacionados con la tesis

Papel de las fosfoinositol 3-kinasas en la resistencia al uso de temozolomida en pacientes con gliomas de alto grado

León Darío Ortiz Gómez^{1,2}, Heidy Johanna Contreras Martínez³, David Andrés Galvis Pareja³ y Ronald Guillermo Peláez Sánchez⁴

¹Doctorado de Ciencias de la Salud, Escuela de Graduados, Universidad CES, Medellín, Colombia.

²Instituto de Cancerología, Clínica Las Américas-AUNA, Medellín, Colombia.

³Investigaciones Ciencias Farmacéuticas, Universidad CES, Medellín, Colombia.

⁴Grupo de Investigación en Ciencias de la Vida y la Salud, Escuela de Graduados, Universidad CES, Medellín, Colombia.

Título corto: *PIK3c2 β* y resistencia al uso de temozolomida

LDOG: lortiz@uces.edu.co

RGPS: rpelaezp@ces.edu.co

DGP: dagalvis@ces.edu.co

HJCM: hcontreras@ces.edu.co

Autor para la correspondencia:

Leon Darío Ortiz Gómez, MD, MSc, cPhD.

Torre Medica Las Américas, Diagonal 75 B 2^a-80, Teléfono: (57)064-3459287.

Correo electrónico: lortiz@uces.edu.co

14.5 Artículos publicados relacionados con la tesis, no soy primer autor

1. Barrera LM, Ortiz LD, Grisales H, Rojas M, Camargo M. Citometría de flujo en reticulocitos de sangre periférica como indicador de inestabilidad cromosómica en pacientes con gliomas de alto grado. *Biomédica*. 2018 Sep 1;38(3):379–87.
2. Cardona AF, Rojas L, Wills B, Ruiz-Patiño A, Abril L, Hakim F, et al. A comprehensive analysis of factors related to carmustine/bevacizumab response in recurrent glioblastoma. *Clin Transl Oncol*. 2019 Oct;21(10):1364–73.
3. Barrera Arenas LM, Restrepo Atehortúa J, Ortiz LD, Camargo Guerrero M. Búsqueda de nuevos biomarcadores genéticos en gliomas de alto grado. *Actual Biológicas [Internet]*. 2020 Feb 26 [cited 2020 Oct 27];41(111).

14.6 Poster relacionados con la tesis

Proyecto 41571

Perfilamiento genómico exhaustivo y su utilidad como factor pronóstico de respuesta en pacientes con gliomas de alto grado a la segunda recaída.

León Darío Ortiz Gómez^{1*}, Heidy Johanna Contreras Martínez², Piedad Agudelo-Florez², David Andrés Galvis Pareja³ y Ronald Guillermo Peláez Sánchez⁴

¹Doctorado de Ciencias de la Salud, Escuela de Graduados, Universidad CES, Medellín, Colombia.

²Instituto de Cancerología, Clínica Las Américas-AUNA, Medellín, Colombia.

³Investigaciones Ciencias Farmacéuticas, Universidad CES, Medellín, Colombia.

⁴Grupo de Investigación en Ciencias de la Vida y la Salud, Escuela de Graduados, Universidad CES, Medellín, Colombia.

Antecedentes:

- El tratamiento en los pacientes con gliomas de alto grado incluye radioterapia y temozolomida.
- La temozolomida metila las guaninas del ADN, lo cual conlleva a errores de apareamiento entre la guanina y la citosina, cambiándose esta última por timina, activando el sistema de reparación de errores de emparejamiento del ADN (DNA mismatch repair - MMR), el cual repara solo la cadena con la timina, dejando intacta la que tiene la guanina metilada.
- Estos errores generan apoptosis celular en las células cancerígenas.
- No obstante, algunos pacientes no responden a la temozolomida, ya que tienen un mecanismo de reversión de la metilación mediante la enzima O6-metilguanina-DNA-metiltransferasa (MGMT).
- La transcripción del gen que codifica para la proteína MGMT está regulado por la metilación de su promotor.
- Los promotores metilados bloquean la producción de la enzima, mientras los no metilados favorecen su transcripción.
- Este biomarcador se ha utilizado como un factor pronóstico en los pacientes en tratamiento con temozolomida, esperando que los pacientes que no producen la enzima respondan al tratamiento.
- Sin embargo, no todos los pacientes responden de forma similar, lo cual sugiere la existencia de otros genes involucrados en la resistencia a la temozolomida.

Objetivos: Identificar los genes asociados con la resistencia a temozolomida en pacientes con gliomas de alto grado mediante el perfilamiento de genes asociados con cáncer.

Metodología: es un estudio observacional, de cohorte, ambispectivo, donde la ocurrencia del evento se registró durante el seguimiento. Se pretendió dar respuesta al principio de plausibilidad biológica a través de la explicación de que la presencia de los genes en las personas con diagnóstico de glioma de alto grado, antecede la aparición de la segunda recaída en la cohorte en estudio; esto controlado por variables confusoras y de interacción. Se captó un grupo de 31 pacientes con gliomas de alto grado, a los cuales se les realizó la caracterización clínica, imagenológica y patológica. Se realizó el secuenciamiento de 324 genes relacionados con diferentes tipos de cáncer y posteriormente se realizó un análisis estadístico para determinar los genes que más se relacionaban con la resistencia al tratamiento. Finalmente, se realizó un análisis bioinformático para determinar el efecto de las mutaciones en los genes e identificar las rutas metabólicas afectadas en estos pacientes.

Resultados:

- Fueron incluidos en la investigación 31 pacientes con gliomas de alto grado, a los cuales se les realizó secuenciación de 324 genes asociados a diferentes tipos de cáncer, encontrándose que los genes relacionados con la segunda recaída, luego del uso de temozolomida en el protocolo Stupp y metronómica, fueron: *PIK3C2B* con un HR ajustado 82,37 (IC95% 8,36-811,67, p=0,000), *KIT* con un HR 10,24 (IC95% 2,42-43,34, p=0,002), *ERBB3* con un HR 13,20 (IC95% 2,77-62,77, p=0,001) y *MLH1* con un HR 8,50 (IC95% 1,83-39,45, p=0,006).
- Adicionalmente se encontró que con estas mutaciones posiblemente se altera la vía metabólica PI3K-AKT-mTOR y el sistema de reparación MMR.
- El análisis bioinformático, permitió caracterizar la mutación y analizar el impacto en las vías relacionadas con cáncer, confirmando los resultados obtenidos a partir de la aplicación de pruebas estadísticas.

Conclusiones: teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se puede sugerir la búsqueda de mutación en los genes *PIK3C2B*, *ERBB3*, *KIT* y *MLH1*, que en conjunto con la información suministrada sobre la metilación del promotor del gen que codifica para la MGMT, puede ayudar a tener argumentos más precisos para el pronóstico de los pacientes con gliomas de alto grado que son tratados con temozolomida.

Tabla 1. Análisis multivariado para identificar los genes mutados relacionados con la segunda recaída, luego del uso de temozolomida en la PS y metronómica, en pacientes con gliomas de alto grado

Gen	Valor p	HRa IC 95%	Valor p	HRa IC 95%
PIK3C2B	0,004	11,81 (2,258 - 84,45)	0,000	82,37 (8,36 - 811,67)
KIT	0,004	3,985 (1,304 - 13,18)	0,002	10,24 (2,42 - 43,34)
ERBB3	0,04	3,871 (1,066 - 14,04)	0,001	13,20 (2,77 - 62,77)
MLH1	0,06	8,528 (2,950 - 23,09)	0,006	8,50 (1,83 - 39,45)

Figura 1. Curvas de supervivencia según el método Kaplan Meier. En la gráfica se muestra el comportamiento a la segunda recaída, dependiendo de si se tienen o la mutación

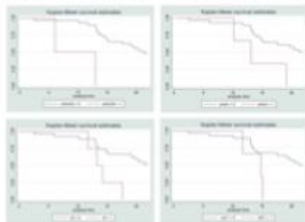
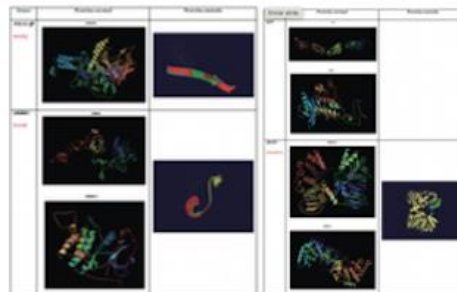


Tabla 2. Análisis estructural del efecto de las mutaciones en las cuatro proteínas codificadas por los cuatro genes mutados relacionados con la segunda recaída.



14.8 Premio



2do. Puesto

ONCOLOGÍA

CATEGORÍA: ESTUDIOS ANALÍTICOS

Para:

Dr. León Daro Ortiz Gomez, Dra. Heidy Johanna Contreras Martínez, Dra. Piedad Agudelo Flórez
Dr. David Andrés Galvis Pareja, Dr. Ronald Guillermo Peláez Sánchez

Nombre del Proyecto:

Mutaciones En Los Genes PIK3c2B, ERBB3, KIT Y MLH1 Se Correlaciona Con La Resistencia Al Uso De Temozolomida En Pacientes Con Gliomas De Alto Grado

Presentado en el:

5^{to} CONGRESO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN HEMATOLOGÍA Y ONCOLOGÍA ACHO

y 5to. CONCURSO DE INVESTIGACIÓN HERNANDO SARASTI

Realizado en Bogotá D.C. - Colombia, los días 17, 18 y 19 de noviembre de 2022.

VIRGINIA ABELLO POLO, MD
Coordinadora Comité Académico
Hematología ACHO

AYLEN VANESSA OSPINA SERRANO, MD
Coordinadora Comité Académico
Oncología ACHO

14.9 Artículos publicados en tiempo del Doctorado, no relacionados con la tesis,

1. Syro LV, Rotondo F, Camargo M, Ortiz LD, Serna CA, Kovacs K. Temozolomide and Pituitary Tumors: Current Understanding, Unresolved Issues, and Future Directions. *Front Endocrinol [Internet]*. 2018 Jun 15 [cited 2020 Jan 18];9.
2. Syro LV, Rotondo F, Ortiz LD, Kovacs K. 65 YEARS OF THE DOUBLE HELIX: Treatment of pituitary tumors with temozolomide: an update. *Endocr Relat Cancer*. 2018 Aug;25(8): T159–69.
3. Cardona AF, Rojas L, Wills B, Bernal L, Ruiz-Patiño A, Arrieta O, et al. Efficacy and safety of Levetiracetam vs. other antiepileptic drugs in Hispanic patients with glioblastoma. *J Neurooncol*. 2018 Jan;136(2):363–71.

15 ANEXOS

Anexo 1 Árbol del problema

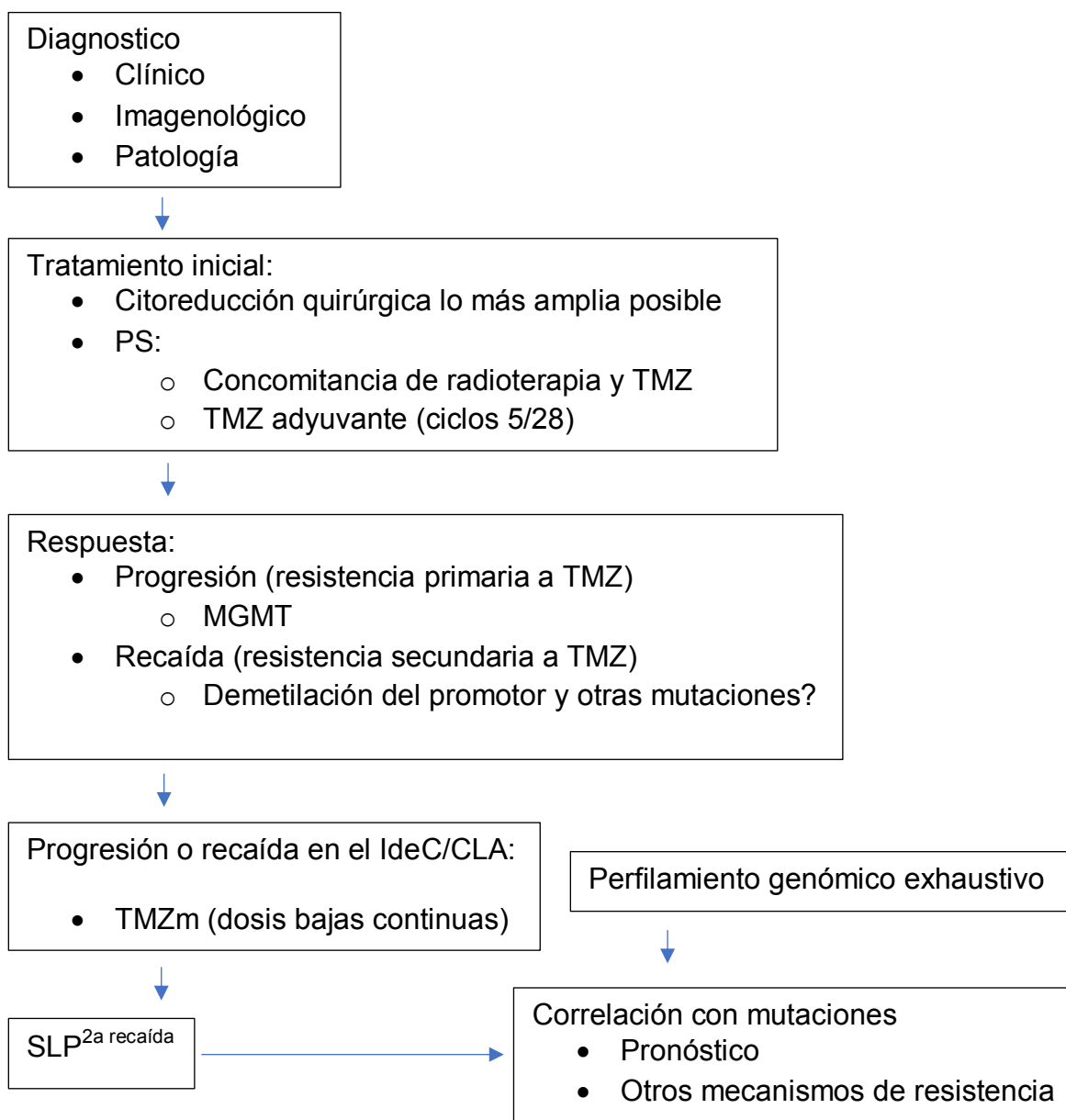


Figura 1. Luego del diagnóstico de HGG, se inicia PS, y ante la progresión o recaída en el Instituto de Cancerología (IdeC) de la Clínica Las Américas-AUNA (CLA), se inicia TMZm y en 31 pacientes se hace perfilamiento genómico exhaustivo. A la segunda recaída se busca la correlación entre la SLP a la segunda recaída y las mutaciones encontradas, buscando las que permitan inferir en el pronóstico, luego del uso de TMZ como parte del PS y metronómica. Ello permite analizar otros mecanismos de resistencia a la TMZ, fuera de la MGMT.

Anexo 2. Modelo multivariado

Se realizó un modelo multivariado de regresión Cox con el fin de ajustar los genes que mostraron algunas de los siguientes criterios de relación con la variable dependiente en el análisis bivariado: Significancia estadística con $p < 0.05$, criterio de Hosmer-Lemeschow con una $p < 0.25$ y por criterio del investigador, los incluidos por estos criterios fueron (Tabla 22).

El ingreso de las variables fue hacia adelante (una a una) y se hizo análisis de interacción para cada uno de los modelos hasta llegar al modelo final.

Tabla 22. Variables que ingresaron al modelo multivariado

Gen	Valor p	HRc IC 95%	Valor p	HRa IC 95%
PIK3C2B	0,004	13,81 (2,258 - 84,45)	0,015	32,288 (1,94 - 534,99)
NOTCH3	0,005	6,026 (1,742 - 20,84)	0,166	5,22 (0,50 - 54,34)
KIT	0,024	3,985 (1,204 - 13,18)	0,069	17,05 (0,79 - 364,7)
ERBB3	0,04	3,871 (1,066 - 14,04)	0,05	20,40 (1,004 - 414,36)
MLH1	0,06	3,528 (0,950 - 13,09)	0,162	9,53 (0,402 - 225,87)
MDM2	0,096	3,744 (0,789 - 17,75)	0,553	0,39 (0,05 - 9,92)
CDK4	0,096	3,744 (0,789 - 17,75)	0,316	0,15 (0,004 - 5,93)
TERT	0,099	2,428 (0,846 - 6,963)	0,253	3,11 (0,44 - 21,8)
NOTCH1	0,103	2,926 (0,804 - 10,65)	0,532	0,37 (0,018 - 7,92)
STAG2	0,137	3,107 (0,698 - 13,82)	0,424	3,49 (0,16 - 74,99)
RB1	0,222	2,286 (0,611 - 7,821)	0,816	0,37 (0,18 - 23,3)
DIS3	0,255	0,308 (0,040 - 2,333)	0,317	0,19 (0,007 - 4,8)
KDR	0,255	0,308 (0,040 - 2,333)	0,91	0,83 (0,32 - 20,9)
ATRX	0,273	0,323 (0,042 - 2,439)	0,64	0,45 (0,17 - 11,91)

Se retiran *RB1* y *MDM2* y se observa cómo se van modificando el HR ajustado en las variables que quedan, por ejemplo, para *PIK3C2 β* el HR en el modelo que aún tenía *RB1* y *MDM2* era 32,288 (IC95% 1,94-534,99) y al retirarlos del modelo queda HR 37,62 (IC95% 1,04-48,21) o sea que el riesgo de segunda recaída después de recibir temozolomida metronómica, teniendo la mutación del gen para de 32 a 37 veces (Tabla 23).

Tabla 23. Modelo 1: variables que ingresaron al modelo, sin *RB1* y *MDM2*.

Gen	Valor p	HRc IC 95%	Valor p	HRa IC 95%
-----	---------	------------	---------	------------

PIK3C2B	0,004	13,81 (2,258 - 84,45)	0,004	37,62 (1,04 -48,21)
NOTCH3	0,005	6,026 (1,742 - 20,84)	0,172	5,05 (0,49 - 50,8)
KIT	0,024	3,985 (1,204 - 13,18)	0,037	20,23 (1,34 - 304,2)
ERBB3	0,04	3,871 (1,066 - 14,04)	0,037	22,12 (1,20 - 406,3)
MLH1	0,06	3,528 (0,950 - 13,09)	0,045	9,53 (0,402 -225,87)
CDK4	0,096	3,744 (0,789 - 17,75)	0,305	0,15 (0,004 - 5,63)
TERT	0,099	2,428 (0,846 - 6,963)	0,224	2,76 (0,53 - 13,98)
NOTCH1	0,103	2,926 (0,804 - 10,65)	0,524	0,37 (0,018 - 7,63)
STAG2	0,137	3,107 (0,698 - 13,82)	0,327	2,64 (0,37- 18,6)
DIS3	0,255	0,308 (0,040 - 2,333)	0,331	0,19 (0,007 - 5,18)
KDR	0,255	0,308 (0,040 - 2,333)	0,877	0,76 (0,31 - 18,8)
ATRX	0,273	0,323 (0,042 - 2,439)	0,586	0,41 (0,017 -9,78)

Se retiran *KDR* y se observa como la mayoría de los HR no se modifican, excepto para *NOTCH1*, *DIS3* y *ATRX* (Tabla 24).

Tabla 24. Modelo 2: variables que ingresaron al modelo, sin *KDR*.

Gen	Valor p	HRc IC 95%	Valor p	HRa IC 95%
PIK3C2B	0,004	13,81 (2,258 - 84,45)	0,004	37,62 (1,04 -48,21)
NOTCH3	0,005	6,026 (1,742 - 20,84)	0,172	5,05 (0,49 - 50,8)
KIT	0,024	3,985 (1,204 - 13,18)	0,037	20,23 (1,34 - 304,2)
ERBB3	0,04	3,871 (1,066 - 14,04)	0,037	22,12 (1,20 - 406,3)
MLH1	0,06	3,528 (0,950 - 13,09)	0,045	9,53 (0,402 -225,87)
CDK4	0,096	3,744 (0,789 - 17,75)	0,312	0,15 (0,004 - 5,71)
TERT	0,099	2,428 (0,846 - 6,963)	0,224	2,76 (0,53 - 13,98)
NOTCH1	0,103	2,926 (0,804 - 10,65)	0,538	0,39 (0,021 - 7,45)
STAG2	0,137	3,107 (0,698 - 13,82)	0,33	2,64 (0,37- 18,7)
DIS3	0,255	0,308 (0,040 - 2,333)	0,243	0,17 (0,009 - 3,28)
ATRX	0,273	0,323 (0,042 - 2,439)	0,545	0,39 (0,018 -8,17)

Se retira *ATRX* y se observa como varían los HR de los genes restantes y se van insinuando los que quedarán en el modelo final (Tabla 25).

Tabla 25. Modelo 3: variables que ingresaron al modelo, sin *ATRX*.

Gen	Valor p	HRc IC 95%	Valor p	HRa IC 95%
-----	---------	------------	---------	------------

PIK3C2B	0,004	13,81 (2,258 - 84,45)	0,002	41,44 (3,78 - 453,91)
NOTCH3	0,005	6,026 (1,742 - 20,84)	0,172	2,82 (0,55 - 26,11)
KIT	0,024	3,985 (1,204 - 13,18)	0,009	26,12 (2,27 - 299,96)
ERBB3	0,04	3,871 (1,066 - 14,04)	0,018	28,39 (1,77 - 453,60)
MLH1	0,06	3,528 (0,950 - 13,09)	0,048	6,21 (1,04 - 38,14)
CDK4	0,096	3,744 (0,789 - 17,75)	0,301	0,15 (0,004 - 5,31)
TERT	0,099	2,428 (0,846 - 6,963)	0,129	3,34 (0,70 - 15,92)
NOTCH1	0,103	2,926 (0,804 - 10,65)	0,412	0,30 (0,017 - 5,29)
STAG2	0,137	3,107 (0,698 - 13,82)	0,242	3,00 (0,46 - 19,26)
DIS3	0,255	0,308 (0,040 - 2,333)	0,179	0,13 (0,007 - 2,50)

Se retira *NTCH1* y se observa como varían los HR de los genes restantes y se van insinuando los que quedarán en el modelo final (Tabla 26).

Tabla 26. Modelo 4: variables que ingresaron al modelo, sin NOTCH.

Gen	Valor p	HRc IC 95%	Valor p	HRa IC 95%
PIK3C2B	0,004	13,81 (2,258 - 84,45)	0,003	40,8 (3,63 - 459,1)
NOTCH3	0,005	6,026 (1,742 - 20,84)	0,249	3,22 (0,44 - 23,5)
KIT	0,024	3,985 (1,204 - 13,18)	0,004	13,84 (2,27 - 84,1)
ERBB3	0,04	3,871 (1,066 - 14,04)	0,005	11,30 (2,09 - 61,5)
MLH1	0,06	3,528 (0,950 - 13,09)	0,024	7,86 (1,31 - 47,13)
CDK4	0,096	3,744 (0,789 - 17,75)	0,535	0,41 (0,26 - 6,06)
TERT	0,099	2,428 (0,846 - 6,963)	0,187	2,65 (0,63 - 11,2)
STAG2	0,137	3,107 (0,698 - 13,82)	0,223	3,28 (0,48 - 22,32)
DIS3	0,255	0,308 (0,040 - 2,333)	0,241	0,25 (0,025 - 2,51)

Se retira *CD4K* y se observa como varían los HR de los genes restantes y se van insinuando los que quedarán en el modelo final (Tabla 27).

Tabla 27. Modelo 5: variables que ingresaron al modelo, sin CDK4.

Gen	Valor p	HRc IC 95%	Valor p	HRa IC 95%
PIK3C2B	0,004	13,81 (2,258 - 84,45)	0,001	48,4 (4,49 - 523,7)
NOTCH3	0,005	6,026 (1,742 - 20,84)	0,322	2,10 (0,48 - 0,13)
KIT	0,024	3,985 (1,204 - 13,18)	0,005	11,40 (2,05 - 63,24)

Gen	Valor p	HRc IC 95%	Valor p	HRa IC 95%
ERBB3	0,04	3,871 (1,066 - 14,04)	0,005	11,38 (2,09 - 61,9)
MLH1	0,06	3,528 (0,950 - 13,09)	0,008	9,59 (1,81 - 50,89)
TERT	0,099	2,428 (0,846 - 6,963)	0,231	2,20 (0,60 - 8)
STAG2	0,137	3,107 (0,698 - 13,82)	0,164	3,73 (0,58 - 23,90)
DIS3	0,255	0,308 (0,040 - 2,333)	0,229	0,31 (0,034 - 2,79)

Se retira *NOTCH3* y se observa como varían los HR de los genes restantes y se van insinuando los que quedaran en el modelo final, en la que se puede observar que va aumentando especialmente en *PIK3C2 β* , en *KIT* y en *ERBB3* (Tabla 28).

Tabla 28. Modelo 6: variables que ingresaron al modelo, sin NOCTH3.

Gen	Valor p	HRc IC 95%	Valor p	HRa IC 95%
PIK3C2B	0,004	13,81 (2,258 - 84,45)	0,001	58,4 (5,63 - 612,3)
KIT	0,024	3,985 (1,204 - 13,18)	0,001	14,98 (3,03 - 73,99)
ERBB3	0,04	3,871 (1,066 - 14,04)	0,004	11,32 (2,15 - 59,61)
MLH1	0,06	3,528 (0,950 - 13,09)	0,007	9,45 (1,86 - 48,09)
TERT	0,099	2,428 (0,846 - 6,963)	0,315	1,87 (0,54 - 6,42)
STAG2	0,137	3,107 (0,698 - 13,82)	0,101	0,354 (0,028 - 2,30)
DIS3	0,255	0,308 (0,040 - 2,333)	0,223	0,31 (0,028 - 2,30)

Se retira *TERT* y se observa como varían los HR de los genes restantes y se van insinuando los que quedaran en el modelo final (Tabla 29).

Tabla 29. Modelo 7: variables que ingresaron al modelo, sin TERT.

Gen	Valor p	HRc IC 95%	Valor p	HRa IC 95%
PIK3C2B	0,004	13,81 (2,258 - 84,45)	0,001	65,5 (5,77 - 774, 16)
KIT	0,024	3,985 (1,204 - 13,18)	0,001	16,53 (3,36 - 81,37)
ERBB3	0,04	3,871 (1,066 - 14,04)	0,001	11,32 (1,61 - 40,11)
MLH1	0,06	3,528 (0,950 - 13,09)	0,011	8,05 (1,61 - 40,18)
STAG2	0,137	3,107 (0,698 - 13,82)	0,108	4,50 (0,031 - 2,57)
DIS3	0,255	0,308 (0,040 - 2,333)	0,264	0,31 (0,031 - 2,57)

Se retira *DIS3* (Tabla 30).

Tabla 30. Modelo 8: variables que ingresaron al modelo, sin DIS3.

Gen	Valor p	HRc IC 95%	Valor p	HRa IC 95%
PIK3C2B	0,004	13,81 (2,258 - 84,45)	0,001	64,06 (2,74 - 54,06)
KIT	0,024	3,985 (1,204 - 13,18)	0,001	12,17 (3,22 - 80,4)
ERBB3	0,04	3,871 (1,066 - 14,04)	0,001	16,11 (3,22 - 80,48)
MLH1	0,06	3,528 (0,950 - 13,09)	0,004	10 (2,05 - 48,63)
STAG2	0,137	3,107 (0,698 - 13,82)	0,088	5,07 (0,078 - 32,65)

Finalmente se retira *STAG 2* y quedan las variables que cumplieron los criterios, o sea las que tienen significancia estadística, conformándose el modelo final (Tabla 16, anteriormente relacionada).

Tabla 16: Modelo final: genes relacionados con la segunda recaída. Análisis multivariado para identificar los genes mutados asociados a la segunda recaída, tras el uso de temozolomida según PS y TMZm, en pacientes con HGG.

Gen	Valor p	HRc IC 95%	Valor p	HRa IC 95%
PIK3C2B	0,004	13,81 (2,258 - 84,45)	0,000	82,37 (8,36 - 811,67)
KIT	0,024	3,985 (1,204 - 13,18)	0,002	10,24 (2,42 - 43,34)
ERBB3	0,04	3,871 (1,066 - 14,04)	0,001	13,20 (2,77 - 62,77)
MLH1	0,06	3,528 (0,950 - 13,09)	0,006	8,50 (1,83 - 39,45)

Por plausibilidad científica, se agregó IDH, pero no tiene injerencia en el modelo (Tabla 31)

Tabla 31. Variables que conforman el modelo final, adicionando IDH1.

Gen	Valor p	HRc IC 95%	Valor p	HRa IC 95%
PIK3C2B	0,004	13,81 (2,258 - 84,45)	0,000	82,37 (8,36 - 811,67)
KIT	0,024	3,985 (1,204 - 13,18)	0,002	10,24 (2,42 - 43,34)
ERBB3	0,04	3,871 (1,066 - 14,04)	0,001	13,20 (2,77 - 62,77)
MLH1	0,06	3,528 (0,950 - 13,09)	0,006	8,50 (1,83 - 39,45)
IDH1	0,89	1,072 (0,395 - 2,911)	0,683	1,29 (0,36 - 4,56)

Pero no modifica el modelo

Anexo 3. Pacientes en los que cambia el diagnóstico patológico

Con la nueva clasificación de la OMS-5ed, en la que los gliomas los HGG, quedan perteneciendo a la familia de los gliomas difusos infiltrantes del adulto, de los 31 pacientes el 80% conservan el diagnóstico histológico inicial ya que luego del perfilamiento y sin modificar la secuencia de tratamiento, esto es PS al diagnóstico y TMZm a la primera recaída, se reevalúa el diagnóstico en 4 pacientes, así:

Paciente 17: 49 años, femenina. Consulta por cefalea que aumenta con valsalva y cambios afectivo-comportamentales. Al EF: minimal 20/35 y déficit motor y sensitivo izquierdos. En RM LOE frontoparietal derecha. Se lleva a cirugía lográndose una resección del 80%. La patología reportó un GB que se caracterizó como secundario (IHQ estaba mutado para *IDH* y por PCR tenía metilado el promotor de la *MGMT* y no se hizo FISH buscando codeleción 1p/19q). A las cuatro semanas inicia PS recibiendo 64 Gys con TMZ concomitante, seguido de 12 ciclos de TMZ adyuvante. La SLP a la primera recaída fue de 23.1 meses. Se inicio temozolomida metronómica de la cual recibe 2 ciclos con bevacizumab y la SLP a la segunda recaída fue de 26.6 meses. Fallece a los 34 meses de la cirugía inicial (OS). Basados en F-1 CDx se reclasifica como A^{mut-IDH}.

Paciente 19: 49 años, masculino. Consulta por crisis parcial simple motora derecha con curso jacksoniano y disfasia. Al EF: minimal 30/35 y déficit motor y sensitivo derechos. En RM LOE parietal izquierda. Se lleva a cirugía lográndose una resección del 20%. Analizando la patología y los hallazgos imagenológicos se caracterizó como un GB (no se hizo FISH buscando codeleción 1p/19q, ni IHQ buscando mutación de *IDH*, ni PCR buscando metilación del promotor de la *MGMT*). A las cuatro semanas inicia PS recibiendo 64 Gys con TMZ concomitante, seguido de 6 ciclos de TMZ adyuvante. La SLP a la primera recaída fue de 18.4 meses. Se inicio temozolomida metronómica de la cual recibe 6 ciclos y la SLP a la segunda recaída fue de 28.8 meses. Estaba con vida a los 24 meses de cierre del estudio. Basados en F-1 CDx se reclasifica como A^{mut-IDH, no codeleción 1p/19q, G3-4}

Paciente 26: 51 años, femenino. Consulta por cefalea y crisis tónico-clónica generalizada. Al EF: minimal 30/35. En RM LOE temporal derecha. Se lleva a cirugía lográndose una resección del 60%. La patología reportó un astrocitoma anaplásico, mutado para *IDH* por IHQ (pero a los días de haber iniciado el protocolo Stupp llega FISH con codeleción 1p/19q). No se hizo PCR buscando metilación del promotor de la *MGMT*. A las cinco semanas inicia PS recibiendo 64 Gys con TMZ concomitante, seguido de 8 ciclos de TMZ adyuvante. La SLP a la primera recaída fue de 52.6 meses. Se inicio entonces temozolomida metronómica

de la cual recibe 10 ciclos con bevacizumab y la SLP a la segunda recaída fue de 64.4 meses. En relación con la sobrevida global (OS) estaba con vida a los 24 meses de cierre del estudio. Basados en F-1 CDx se reclasifica como O^{mut-IDH, codele-1p/19q, G3}

Paciente 30: 60 años, masculino: Cuadro de dos meses de evolución de cefalea que aumenta con valsalva y obscuraciones. Al examen físico con papiledema y Hemianopsia homónima derecha. En RM cerebral lesión ocupando espacio (LOE) occipital izquierda, se lleva a cirugía con una resección del 70%. La patología reporta oligoastrocitoma anaplásico, con mutación para *IDH1* por inmunohistoquímica (IHQ) y metilación de promotor de la *MGMT* por PCR. No se buscó codeleción 1p/19q. A las tres semanas se inicia Protocolo Stupp y recibe radioterapia (RT) hasta 64 Gys con temozolomida adyuvante por 5 ciclos. Se documenta deterioro clínico y progresión imagenológica a los 10.1 meses (SLP a la primera recaída). Se le ofrece temozolomida (TMZ) dosis metronómica de lo cual recibe 2 ciclos, con bevacizumab y la segunda recaída se presenta a los 13.3 meses y fallece a los 45 meses (OS). Basados en F-1 CDx se reclasifica como A^{mut-IDH, no codele-1p/19q, G3-4}

Tabla 32. Pacientes en los que reevalúa diagnóstico patológico

Diagnóstico inicial					F1-CDx				Desenlaces		
Paciente	Diagnóstico histológico inicial	Codeleción 1p/19q	Mutación IDH	Metilación del promotor MGMT	Tipo de muestra	Mutaciones conocidas cancer en	Mutaciones de significado incierto	Reclasificación patológica	SLP a la primera recaída (meses)	SLP a la segunda recaída (meses)	Sobrevida global (meses)
17	Glioblastoma	No se busca	mutado	Metilado	Bloque de parafina	<i>IDH1 R132H</i> <i>TP53 Y236C</i>	<i>ATRX</i> <i>MED12</i> <i>CD22</i> <i>ZNF703</i> <i>EP300</i> <i>KDR</i>	A ^{mut-IDH,G3-4}	23.1	26.6	34
19	Glioblastoma	No se busca	No se busca	No se busca	Bloque de parafina	<i>IDH1 R132H</i> <i>ATRX E453fs*15</i> <i>KEL R428C</i> <i>TP53 V157F</i>	<i>GATA4</i> <i>TYR03</i>	A ^{mut-IDH,G3-4}	18.4	28.8	Vivo
26	Astrocitoma Anaplásico	1p/19q +	mutado	No se busca	Bloque de parafina	<i>IDH1 R132H</i> <i>SOX2 amplification - equivocal†</i> <i>CIC W269*</i> <i>TERT promoter - 146C>T</i>	<i>CXCR4</i> <i>TEK</i> <i>FGF19, TGFBR2</i> <i>IRS2</i> <i>SPEN</i>	O ^{mut-IDH,1p19qG3}	52.6	64.4	vivo

Diagnóstico inicial					F1-CDx				Desenlaces		
Paciente	Diagnóstico histológico inicial	Codeleción 1p/19q	Mutación IDH	Metilación del promotor MGMT	Tipo de muestra	Mutaciones conocidas en cancer	Mutaciones de significado incierto	Reclasificación patológica	SLP a la primera recaída (meses)	SLP a la segunda recaída (meses)	Sobrevida global (meses)
30	Oligoastrocitoma Anaplásico	No se busca	Silvestre	Metilado	Bloque de parafina	<i>IDH1 R132H</i> <i>CDH1 R335*</i> <i>TP53 R175H</i>	<i>ATRX</i> <i>KLHL6</i> <i>DIS3</i> <i>MLL2</i> <i>FANCL</i> <i>MSH3</i> <i>KDR</i> <i>POLD1.</i>	A ¹⁰¹ /IDH1R132H	10.1	13.3	45

Los cambios en el diagnóstico de patología de los pacientes con gliomas de alto grado, de la 4ª edición de la OMS del 2016 a la 5ª edición del 2021, tienen implicaciones pronósticas y en ocasiones del tratamiento, ejemplo de ello son:

El paciente 17 contaba con un diagnóstico histológico de GGB posterior al perfilamiento genético y aplicar el algoritmo de clasificación de la OMS 2021, se obtiene una reclasificación a un astrocitoma, el cual es considerado como un tumor menos severo comparado con los GB. Este paciente tuvo la primera recaída a los 23.1 meses y la segunda a los 26.6 meses, con un tiempo de supervivencia global fue de 34 meses, el cual es un desenlace más largo de lo esperado para un GB.

El paciente 19 también fue clasificado inicialmente como un GB, posterior a la secuenciación del tumor se reclasifica como un astrocitoma, con una primera recaída a los 18.4 meses y una segunda a los 28.8 meses, este se encontraba con vida a los 24 meses de cierre del estudio, lo que indica que este no tenía un tumor tan severo como lo son los GB, lo que puede generar consecuencias a nivel psicológico y físico que en este estudio no fueron tenidas en cuenta.

El paciente 26 tenía un diagnóstico inicial de un astrocitoma y después de obtener las características genéticas del tumor este es reclasificado como un oligodendroglioma, mutado para *IDH* y con codeleción 1p/19q, cuyo desenlace es que al momento del corte del estudio este aún se encontraba con vida, propio de los oligoastrocitomas que tienen expectativas de vida más largas que los astrocitomas. No se modificó el tratamiento del protocolo Stupp, ya que el perfilamiento llegó posterior al suministro de este, sin embargo, se puede hacer la

observación de que si se tuviera en cuenta la reclasificación algunos centros optarían por dar primero la quimioterapia y aplazar la radioterapia, con esto se demuestra la necesidad de una correcta clasificación, basada en el perfilamiento genómico para tener una mayor certeza pronóstica y proponer el tratamiento más adecuado.

En el caso del paciente 30 con un oligoastrocitoma, término ya no utilizado debido a que la nueva clasificación de los tumores de SNC, 5ª edición 2021, no considera los tumores mixtos compuestos por astrocitos y oligodendrocitos. En este caso es evidente que era un tumor derivado solo de los astrocitos (astrocitoma), como se comprobó al efectuar el perfilamiento genómico y reclasificarlo. Ello explica por qué el desenlace se aproxima más a los observados en los astrocitomas que en los oligodendrogliomas, ya que este paciente tuvo con una primera recaída a los 10.1 meses posterior a la cirugía inicial y después de recibir dosis metronómica de temozolomida tuvo una segunda recaída a los 13.3 meses y una supervivencia global de 45 meses.

Anexo 4. Consentimiento informado

Consentimiento Informado se dirige a pacientes y cuidadores.

Investigador principal: León Darío Ortiz Gómez.

Nombre del Patrocinador: Universidad CES

Nombre de la Propuesta: Evaluación del perfilamiento genómico exhaustivo y su utilidad como factor pronóstico y predictor de respuesta al tratamiento en pacientes con Glioma de Alto Grado

Introducción: Mi nombre es León Darío Ortiz Gómez, soy estudiante de Doctorado en la Universidad CES, actualmente en compañía de un grupo de investigadores estamos realizando un proyecto sobre una prueba que permita predecir la respuesta del paciente al fármaco temozolamida, y así seleccionar la mejor terapia para los pacientes. Este estudio está avalado por la Universidad CES. En este documento se le dará información para invitarlo a participar de esta investigación. Tiene la libertad de decidir si quiere participar o no. Antes de decidirse, puede hablar con alguien con el que se sienta cómodo, sobre la investigación. Puede que haya algunas palabras que no entienda; si tiene preguntas, puede preguntarme a mí o algún miembro del equipo investigador.

Propósito: En algunas enfermedades los pacientes reciben medicamentos que por diferentes motivos no son efectivos e implican un alto costo; a esto se le suma el riesgo de presentar los efectos secundarios que son típicos de todos los medicamentos. A través de su donación de una muestra de sangre, se busca una prueba que permita decir si un paciente puede responder a un tratamiento o no, con el fin de evitarle los efectos adversos propios de todos los fármacos, y poder seleccionar la mejor alternativa medicamentosa para que los pacientes puedan mejorar su calidad de vida.

Objetivo de la investigación: Buscar una prueba de laboratorio que permita predecir la respuesta a la temozolamida en el tratamiento de gliomas de alto grado.

Libertad: Las personas que vayan a participar en la investigación tendrán la libertad de retirarse de la investigación en cualquier momento, sin que esto tenga alguna implicación.

Confidencialidad: Se mantendrá la confidencialidad de la información de forma que nadie pueda tener acceso a los datos personales de los participantes. La información se codificará de forma que no se permitiera la identificación de las personas en el momento del análisis final de los datos.

Gratuidad: Ningún participante de la investigación deberá cancelar dinero para participar en esta.

Derecho a informarse sobre el curso de la investigación: Los participantes de la investigación podrán recibir información sobre el curso de ésta, cada vez que lo soliciten. Además, al final de la investigación se presentará un informe sobre los resultados obtenidos.

Créditos: El proyecto será financiado por la Universidad CES.

Beneficios: Los participantes de la investigación, no recibirán ningún incentivo por la participación en el estudio sin embargo los resultados de este estudio permitirán ampliar los enfoques de manejo a futuros pacientes con glioblastoma.

Respeto por la condición humana: Durante todo el estudio se tendrá presente el respeto por la condición humana, tratando a todos los participantes por igual sin ningún tipo de discriminación, sin tener en cuenta el nivel socioeconómico, educativo o cultural de las personas que participarán en la investigación.

Respeto por la integridad de la información: La información que se obtenga de esta investigación será analizada de tal forma que no sufra ningún cambio que disminuya la validez del estudio.

Riesgos: Los posibles riesgos pueden ser incomodidades menores como dolor durante la punción, hematomas de pequeño tamaño y/o infección secundaria, riesgo que será controlado utilizando agujas y material único, nuevo y estéril para cada paciente, así como alcohol previo a la punción. Es poco probable que sucedan estos efectos y si esto llegase a pasar, se realizaría el manejo indicado en el lugar de atención donde se realice la toma de la muestra.

A quién contactar: Si tiene cualquier pregunta puede hacerla ahora o más tarde, incluso después de haberse iniciado el estudio, León Darío Ortiz Gómez, al correo electrónico: _____ Celular: _____

AUTORIZACIÓN

Al firmar este documento está diciendo que:

- Está de acuerdo con participar en el estudio.
- Le hemos explicado la información que contiene este documento y hemos contestado todas sus preguntas.
- Ha recibido copia de este procedimiento

Usted sabe que:

- En cualquier momento, puede dejar de participar en el estudio y no le pasará nada.
- Puede llamar a los investigadores si tiene alguna pregunta sobre el estudio o sobre sus derechos.

Yo, _____, con cédula de ciudadanía número _____ de _____, he leído el procedimiento descrito arriba. El (la) investigador (a) me ha explicado el estudio y ha contestado mis preguntas. Voluntariamente doy mi consentimiento para participar en el estudio sobre **respuesta a la temozolomida**.

Autoriza ser contactado para obtención de información: SI _____
NO _____

Nombre del Participante _____

Firma del Participante _____

Fecha _____ Día/mes/año



Si es analfabeto

Los participantes analfabetos debieran incluir su huella dactilar también.

He sido testigo de la lectura exacta del documento de consentimiento para el potencial participante y el individuo ha tenido la oportunidad de hacer preguntas. Confirmando que el individuo ha dado consentimiento libremente.

Nombre del testigo _____

Firma del testigo _____

Fecha _____ Día/mes/año

He sido testigo de la lectura exacta del documento de consentimiento para el potencial participante y el individuo ha tenido la oportunidad de hacer preguntas. Confirmando que el individuo ha dado consentimiento libremente.

Nombre del testigo _____

Firma del testigo _____

Fecha _____ Día/mes/año

He leído con exactitud o he sido testigo de la lectura exacta del documento de consentimiento informado para el potencial participante y el individuo ha tenido la oportunidad de hacer preguntas. Confirmando que el individuo ha dado consentimiento libremente.

Nombre del Investigador _____

Firma del Investigador _____

Fecha _____ Día/mes/año

Ha sido proporcionada al participante una copia de este documento de Consentimiento Informado _____ (iniciales del investigador/asistente)

Muchas gracias por participar

Anexo 5. Aval ético

Aval de protocolo "Capacidad predictiva de la formación de micronúcleos para el uso de la temozolomida en gliomas de alto grado"

Acta N° 122
Proyecto: "CAPACIDAD PREDICTIVA DE LA FORMACIÓN DE MICRÓNÚCLEOS PARA EL USO DE LA TEMOZOLOMIDA EN GLIOMAS DE ALTO GRADO"
Código del proyecto: 763
Primera revisión

Medellín, 10 de mayo de 2018

Doctor
DAVID GALVIS PAREJA
dagalvis@ces.edu.co
Universidad CES

El Comité Institucional de Ética de Investigación en Humanos en su sesión número 122 del 08 de mayo de 2018, sometió a consideración el proyecto "CAPACIDAD PREDICTIVA DE LA FORMACIÓN DE MICRÓNÚCLEOS PARA EL USO DE LA TEMOZOLOMIDA EN GLIOMAS DE ALTO GRADO", cuyos investigadores son los doctores Rubén Darío Manrique Hernández, Piedad Agudelo Florez, David Galvis Pareja, León Ortiz. El proyecto está adscrito al grupo de investigación Ciencias Básicas.

El objetivo general del estudio es: Estimar la capacidad predictiva de la formación de micronúcleos in vitro para permitir evaluar la eficacia que tiene la adición de TMZ en terminos de sobrevida (SLP6m y OS) en el tratamiento de gliomas de alto grado

En la evaluación del proyecto, participaron los siguientes miembros del Comité: Doctor Rubén Darío Manrique Hernández, Doctora Clara María Mesa Restrepo, Doctor Julián Emilio Vélez Ríos, Doctora Andrea Echavarría Arbleda, Doctor John Wilson Osori, Doctora Mónica María Massaro Ceballos, Doctora Nadia Semenova Moratto, Doctor David Andrés Galvis Pareja, Doctor Arlex Uriel Palacios Barahona.

De acuerdo con los conceptos y opiniones de los miembros del comité, expuestos y sometidos a consideración durante la sesión descrita cuyo contenido explícito aparece en el acta correspondiente se desprenden las siguientes consideraciones principales:


CONCLUSIÓN:

Una vez revisada la documentación, el comité concluye que el proyecto está ceñido a los principios éticos que regulan la investigación en seres humanos y que el equipo de investigación es idóneo para desarrollar el proyecto de acuerdo con los principios de validez y confiabilidad, por consiguiente, el Comité Institucional de Ética **APRUEBA** el proyecto por el tiempo que dure su ejecución.

Es responsabilidad del Comité de Ética, garantizar el cumplimiento de los compromisos éticos establecidos en el protocolo del proyecto aprobado. En virtud de lo anterior, el investigador principal se compromete a:

TERIO DE EDUCACIÓN NACIONAL
N° NÚMERO 1371
www.ces.edu.co

Calle 10 A N° 22-04 A.A. 054 591 Comutador 444 05 55 Fax 266 60 46 NIT 890.984.002-6 Medellín / Colombia VIGILADA MINEEDUCACIÓN



Acta N° 122
Proyecto: "CAPACIDAD PREDICTIVA DE LA FORMACIÓN DE
MICRONÚCLEOS PARA EL USO DE LA TEMOZOLOMIDA EN GLIOMAS DE
ALTO GRADO"
Código del proyecto: 763
Primera revisión



UNIVERSIDAD CES

Un compromiso con la excelencia
Resolución del Ministerio de Educación Nacional No. 1771 del 22 de marzo de 2007

1977

40

AÑOS

2017

- ✓ Informar por escrito a los investigadores sobre la obligación que tienen de notificar oportunamente al comité: los eventos adversos serios que ocurran, las desviaciones mayores al protocolo, las fallas en la aplicación de las buenas prácticas clínicas, las violaciones a las normas que regulan el ejercicio de la actividad científica, las denuncias que hagan personas, participantes o no en el estudio, sobre fallas en la protección de los derechos o el bienestar de las personas, alertas sobre posibles fraudes o mala conducta científica en el estudio.
- ✓ Entregar a cada participante una copia del documento de consentimiento que haya firmado.
- ✓ Enviar al Comité de Ética en Investigación, con la frecuencia que éste determine, copia en formato de entrega de copia del consentimiento.
- ✓ Garantizar que no haya entre ellos y los testigos que firman el consentimiento informado, relaciones de primer grado de afinidad, segundo civil o cuarto de consanguinidad. De ello dejarán constancia en el mismo documento.
- ✓ El Comité de Ética en Investigación podrá realizar, con el apoyo de sus miembros o de personas con experiencia e idoneidad, visitas de supervisión a los estudios en proceso de realización con el fin de verificar el cumplimiento de los compromisos éticos.
- ✓ El Comité de Ética en Investigación podrá solicitar la suspensión temporal o definitiva del estudio cuando concluya que los investigadores o los patrocinadores han incurrido en una falta grave a los principios y compromisos éticos durante la realización del estudio. Cuando sea necesario el comité notificará a la autoridad de salud que le corresponda conocer la situación.

Se adjunta a esta comunicación, la versión final aprobada del consentimiento informado, esta es la versión que deberá utilizarse en el desarrollo de la investigación. Cualquier modificación que se haga deberá ser avalada por el Comité Institucional de Ética de la Universidad CES antes de su aplicación. De no ser así, será considerada una violación ética grave en el desarrollo de la investigación.

Con la firma de recibido de este documento, los investigadores se comprometen a desarrollar el proyecto bajo las condiciones aprobadas en el Comité Institucional de Ética.

RUBÉN DARÍO MANRIQUE HERNANDEZ

Presidente (E)

Comité de Ética en Investigación en Humanos Universidad CES.

comiteeticahumanos@ces.edu.co

MINISTERIO DE EDUCACIÓN NACIONAL
N.º NÚMERO 1371

www.ces.edu.co

Calle 10 A N° 22-04

A.A. 054 591

Conmutador 444 05 55

Fax 266 60 46

NIT 890.984.002-6

Medellín / Colombia

VIGILADA MINEDUCACIÓN

Cambio de título y de investigador principal.

Medellín, 19 de noviembre de 2018



Doctor
LEÓN DARIO ORTIZ GÓMEZ
Investigador
UNIVERSIDAD CES
Ciudad

El Comité Institucional de Ética en Investigación en Humanos recibió su solicitud para el proyecto: **“Capacidad predictiva de la formación de micronúcleos para el uso de la temozolamida en gliomas de alto grado”**, el cual fue aprobado en la sesión 122 del 08 de mayo de 2018.

Teniendo en cuenta el cambio de investigador principal el cual será el Doctor Leon Dario Ortiz Gómez y el título del proyecto **“Evaluación de la formación de Micronúcleos in vitro y su utilidad como factor pronóstico y predictivo de respuesta al tratamiento con Temozolamida en pacientes con Glioma de Alto Grado”**, el comité de ética AUTORIZA el cambio informado y EXTIENDE EL AVAL ÉTICO del estudio en mención

Se espera que los demás aspectos éticos se sigan cumpliendo, acorde con lo inicialmente aprobado.

RUBÉN DARIO MANRIQUE HERNÁNDEZ
Presidente
Comité de Ética en Investigación en Humanos Universidad CES.
comiteeticahumanos@ces.edu.co

Aval de cambios a protocolo de perfilamiento genómico



Medellín, 24 de noviembre de 2020.

Doctor:
LEÓN DARÍO ORTIZ GÓMEZ
lortiz@uces.edu.co
Investigadora Principal

El Comité Institucional de Ética en Investigación en Humanos Universidad CES se recibió su solicitud para extender el aval ético del proyecto ***“EVALUACIÓN DE LA FORMACIÓN DE MICRONÚCLEOS IN VITRO Y SU UTILIDAD COMO FACTOR PRONÓSTICO Y PREDICTOR DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON TEMOZOLAMIDA EN PACIENTES CON GLIOMA DE ALTO GRADO”***. Aprobado en sesión 122 del 08 de mayo del 2018.

En la extensión de aval se realizan los siguientes cambios:

1. Modificación del título del proyecto a: ***“EVALUACIÓN DEL PERFILAMIENTO GENÓMICO EXHAUSTIVO Y SU UTILIDAD COMO FACTOR PRONÓSTICO Y PREDICTOR DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO EN PACIENTES CON GLIOMA DE ALTO GRADO”***.
2. Cambio en la pregunta de investigación a: ***“¿La determinación del perfil genómico exhaustivo tiene utilidad como factor pronóstico y predictor de respuesta en pacientes con glioma de alto grado a la segunda recaída y con un índice de Karnofsky mayor del 60%?”***
3. Modificación del objetivo general a: ***“Evaluar si el perfil genómico exhaustivo tiene utilidad como factor pronóstico y predictor de respuesta en pacientes con glioma de alto grado a la segunda recaída y con un índice de Karnofsky mayor del 60%”***
4. Cambio de los objetivos específicos (3, 4, 5, 6 y 7) a:
 - Describir el reporte de Foundation-one del perfil genómico exhaustivo ya sea en bloque de parafina del tumor o en muestra líquida
 - Efectuar un análisis bioinformático de los 324 genes, estado microsatelital y carga tumoral de los participantes
 - Desde el punto de vista farmacogenómico seleccionar la mejor opción terapéutica
 - Evaluar el valor pronóstico de la relación entre el perfilamiento frente al desenlace
 - Evaluar la capacidad predictiva que tiene el perfilamiento para definir la respuesta al tratamiento.



5. Modificación de la hipótesis a: "Ho: El perfil genómico exhaustivo no tiene utilidad como factor pronóstico y predictor de respuesta en pacientes con glioma de alto grado a la segunda recaída y con un índice de Karnofsky mayor del 60%".
6. Cambio en la metodología: "No se va a emplear la citometría de flujo sino que se hará secuenciación de nueva generación haciendo un perfilamiento genómico exhaustivo de genes involucrados en gliomas, en la misma muestra de sangre propuesta en el protocolo anterior".

"Además se incluye el mismo análisis de los bloques de parafina almacenados luego de la biopsia de rutina al diagnóstico y/o recaída"

El comité extiende el aval ético solicitado, bajo el mismo rigor científico y con los mismos compromisos éticos del estudio originalmente aprobado.

Cordialmente,

RICARDO POSADA SALDARRIAGA

Presidente (S)

Comité de Ética en Investigación en Humanos Universidad CES.

comiteeticahumanos@ces.edu.co



Anexo 6. Aval de comité de ética al consentimiento informado

APROBADO
10 MAY 2018
Comité Institucional
de ética en investigación
en humanos
Universidad CES

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Este Formulario de Consentimiento Informado se dirige a pacientes y cuidadores.

Investigador principal: David Galvis Pareja.

Nombre del Patrocinador: Universidad CES.

Nombre de la Propuesta: *capacidad predictiva de la formación de micronúcleos para el uso de la temozolomida en gliomas de alto grado*

Introducción

Mi nombre es David Galvis, soy docente en la Universidad CES, actualmente en compañía de un grupo de investigadores estamos realizando una proyecto sobre una prueba que permita predecir la respuesta del paciente al fármaco temozolamida, y así seleccionar la mejor terapia para los pacientes. Este estudio está avalado por la Universidad CES.

En este documento se le dará información para invitarlo a participar de esta investigación. Tiene la libertad de decidir si quiere participar o no. Antes de decidirse, puede hablar con alguien con el que se sienta cómodo sobre la investigación. Puede que haya algunas palabras que no entienda; si tiene preguntas, puede preguntarme a mí o algún miembro del equipo investigador.

Propósito

En muchas ocasiones los pacientes son sometidos a tratamientos farmacológicos que son innecesarios y costosos ya que por diferentes motivos fisiopatológicos el paciente no responderá a ese tratamiento. Todo tratamiento con medicamentos implica el riesgo de los efectos adversos. Se hace por lo tanto necesario pensar en pruebas que demuestren si los pacientes responderán a dicho tratamiento o no, para optimizar el tiempo y buscar la mejor terapia farmacológica en pos de mejorar la salud de dichos pacientes.

Objetivos de la investigación

- Estimar la capacidad predictiva de la formación de micronúcleos *in vitro* para permitir evaluar la eficacia que tiene la adición de temozolamida en terminos de sobrevida en el tratamiento de gliomas de alto grado
- Determinar la densidad de micro núcleos en el cultivo basal a diferentes concentraciones de TMZ

Libertad

Las personas que vayan a participar en la investigación tendrán la libertad de retirarse de la investigación en cualquier momento, sin que esto tenga alguna implicación.

Confidencialidad

Se mantendrá la confidencialidad de la información de forma que nadie pueda tener acceso a los datos personales de los participantes. La información se codificará de forma que no se permitiera la identificación de las personas en el momento del análisis final de los datos.

Anexo 7. Comité Ética Instituto de Cancerología

Consejo Institucional de Revisión/ Comité Ético Independiente Instituto de Cancerología S.A.

Medellín, mayo 16 de 2012

Doctor:

Dr. LEON DARIO ORTIZ

Investigador principal.

INSTITUTO DE CANCEROLOGIA

Medellin

1. Referencia: "GENOTOXICIDAD COMO FACTOR PRONOSTICO EN EL TRATAMIENTO DE LOS PACIENTES CON GLIOMA DE ALTO GRADO".

Respetado Dr. Ortiz:

Nos permitimos informarle que con fecha mayo 16 de 2012, el Consejo Institucional de Revisión / Comité Ético Independiente, se reunió y aprobó con número de acta 003 de 2012, el protocolo, el cual será aplicado en el Instituto de Cancerología S.A.

Para su información en la aprobación del documento antes mencionado, estuvieron presentes los siguientes miembros del Consejo Institucional de Revisión/ Comité Ético Independiente Instituto de Cancerología S.A.:

Dr. Diego Gaviria Henao, cirujano, Presidente.

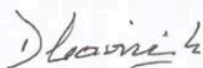
Dr. Joaquín Pablo Rueda Ramírez, Radioterapeuta. Vocero.

Sr. Mario Londoño Mejía, Economista, miembro externo. Vocero.

Sr. Hernán Darío Garcés Maya, Coordinador de Registros Médicos. Vocero.

Sra. Sílvia Bedoya Holguín, Regente de Farmacia. Secretaria

Atentamente,








Dr. Diego Gaviria Henao

Presidente

Consejo Institucional de Revisión/ Comité Ético Independiente Instituto de Cancerología

S.A.

Anexo 8. Reporte de Turnitin

Sección 1						
Título	Fecha de inicio	Fecha Esperada	Fecha de publicación	Puntos disponibles		
Espacio para validación de documentos - Sección 1	16 mar 2023 - 14:51	31 dic 2025 - 14:51	31 dic 2025 - 14:51	100		
 Refrescar Envíos						
Ver Recibo Digital	Título del Envío	Identificador del trabajo de Turnitin	Enviado	Similitud	Calificación	
	Perfilamiento genómico exhaustivo y su utilidad como factor pronóstico de respuesta en pacientes con gliomas de alto grado a la segunda recaída	2104009627	29/05/2023 05:11	15% 	--	Entregar Trabajo   --



Recibo digital

Este recibo confirma que Turnitin ha recibido tu trabajo. A continuación, encontrarás la información del recibo perteneciente a tu entrega.

Autor del envío	Leon Dario Ortiz Gomez
Identificador del trabajo de Turnitin (Identificador de referencia)	2104009627
Título del Envío	Perfilamiento genómico exhaustivo y su utilidad como factor pronóstico de respuesta en pacientes con gliomas de alto grado a la segunda recaída
Título de Tarea	Espacio para validación de documentos
Fecha del envío	29/05/23, 05:11

 Imprimir