



---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
FACULTAD DE MEDICINA  
División de Estudios de Posgrado  
**INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGIA**  
**MANUEL VELASCO SUÁREZ**

**EXPRESIÓN DE MARCADORES DE CÉLULAS MADRE DE GLIOMAS Y SU  
RELACIÓN CON EL PERIODO LIBRE DE PROGRESIÓN Y LA SOBREVIDA  
EN PACIENTES CON NEOPLASIAS GLIALES RECURRENTES.**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL TITULO DE ESPECIALISTA  
EN NEUROCIRUGÍA**

**PRESENTA**

**DR. ALDO GABRIEL EGUILUZ MELENDEZ**

**TUTOR DE TESIS**

**DR. SERGIO MORENO JIMÉNEZ**

Ciudad de México, 24 de Julio de 2018





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



INSTITUTO NACIONAL  
DE NEUROLOGÍA Y  
NEUROCIROLOGÍA  
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN

---

**DR. PABLO LEÓN ORTIZ**  
**DIRECTOR DE ENSEÑANZA**

---

**DR. JUAN LUIS GÓMEZ AMADOR**  
**PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE NEUROCIROLOGÍA**

---

**DR. SERGIO MORENO JIMÉNEZ**  
**TUTOR DE TESIS**

## I. DEDICATORIA

A mi Madre y a mi Padre por su amor y su esfuerzo constante por garantizar que obtuviera la mejor educación dentro y fuera de casa. Por enseñarme a cultivar la justicia, la honradez, la empatía y el respeto a la vida en mi persona y en mi práctica médica.

A Daniel y Andrea por su cariño y apoyo incondicional. Por alentarme, orientarme y aconsejarme en momentos difíciles. Por enseñarme que la felicidad y el éxito sólo son reales cuando son compartidos. Por inculcarme que la familia es primero.

A mis hermanos y hermanas de otra madre por haber estado presentes y por haber confiado en mí siempre. Por ofrecerme un sinnúmero de experiencias y una perspectiva distinta y valiosa en cada etapa de mi vida.

A ti Nadia, por enseñarme a creer en mí, por nuestra mutua admiración, por motivarme a ser mejor cada día, por inspirarme, por ofrecer tu amor sincero y por decidir acompañarme en este gran viaje.

A usted maestro y mentor, que sin pedir nada a cambio, me enseñó lo mejor de usted. Por desafiarne a ser mejor médico, mejor cirujano y mejor persona. Por enseñarme que aquellos hombres que luchan toda la vida son los imprescindibles.

A mis compañeros, amigos y colegas, quienes compartimos largas noches de guardia, extenuantes horas en quirófano, discusiones académicas y no académicas, tiempos difíciles y tiempos alegres, sonrisas y muestras de afecto y sobre todo el intercambio de nuevas ideas.

A mi país, a mi *alma mater* y a mi querido hospital, por darme la oportunidad de servir al pueblo de México.

## II. AGRADECIMIENTOS

Dra. María del Carmen Rubio Osornio

Por su orientación en el diseño de este trabajo, su apoyo en el financiamiento del proyecto y su colaboración en el análisis histopatológico.

Dra. Martha Lilia Tena Suck

Por su colaboración en el análisis histopatológico y su apoyo en el financiamiento del proyecto.

Dr. César Ernesto Mendoza Rosales

Por su colaboración en el análisis histopatológico.

Dra. Romina Rivera Cañas

Por su apoyo en la revisión de estudios de imagen.

Dra. Miryam Ramírez Ordás

Por su apoyo en la revisión de expedientes clínicos y estudios de imagen.

Dr. Carlos Paz Tres

Por su colaboración en el diseño del estudio y por sus contribuciones en la corrección del manuscrito.

Dr. Sergio Moreno Jiménez

Por su colaboración en el diseño del estudio y por sus contribuciones en la corrección del manuscrito.

Dr. Juan Luis Gómez Amador

Por su fomento a la investigación y por sus contribuciones en la corrección del manuscrito.

### III. RESUMEN DE LA INVESTIGACIÓN PROPUESTA:

**INTRODUCCIÓN:** Los gliomas representan el 30% de los tumores cerebrales primarios en adultos, y a pesar de los avances logrados, la recurrencia en esta patología es la regla. Las Células Madre en Gliomas tienen la capacidad de generar células tumorales *in vivo* e *in vitro* y se cree que participan en la resistencia al tratamiento, en la progresión y en la recurrencia tumoral. La expresión de los factores de transcripción SOX (SOX1, SOX2, SOX3) se encargan de mantener un genotipo oncogénico y se asocian a un fenotipo tumoral agresivo. Hasta el momento se desconoce la relación de SOX con IDH1 y Ki67 y su papel pronóstico, por lo que nos planteamos describir la relación de SOX y el PFS y OS de pacientes con gliomas recurrentes atendidos en nuestra institución. **METODOLOGÍA:** Se analizaron de forma retrospectiva 69 pacientes, de los cuales 20 cumplieron con los criterios de inclusión y se describieron variables clínicas, radiológicas e histopatológicas. Se realizaron estudios de correlación y análisis de sobrevida de acuerdo a la expresión de SOX para el PFS y OS. **RESULTADOS:** SOX1, SOX2 y SOX9 muestran un incremento no estadísticamente significativo conforme mayor es el grado histopatológico y se coexpresan con Ki67, factor de proliferación celular. Existe una correlación inversamente proporcional entre el grado de inmunopositividad de SOX1 y la OS ( $r = -0.609$ ,  $p = 0.047$ ). **DISCUSIÓN:** Mayor inmunopositividad de SOX1 podría predecir un peor pronóstico clínico, hallazgo similar al reportado por Raysi Dehcordi quien encontró una correlación inversa entre SOX2 y OS ( $r = -0.75$ ,  $p = 0.001$ ). Existe una interacción entre un genotipo sugestivo de pluripotencialidad (GSC) y la proliferación celular. **CONCLUSIONES:** Futuros estudios deberán detallar los factores ambientales o genéticos involucrados en la activación de SOX1, SOX2 y SOX9 en la fase preclínica de la enfermedad, con la finalidad de ofrecer un tratamiento temprano y curativo.

## IV. ÍNDICE

<b>Sección</b>	<b>Página</b>
I. Dedicatoria.	3
II. Agradecimientos.	4
III. Resumen de la investigación propuesta.	5
IV. Índice.	6
V. Lista de abreviaturas.	7
1. Antecedentes.	10
2. Planteamiento del problema.	28
3. Hipótesis.	30
4. Objetivos.	31
5. Justificación.	33
6. Metodología.	35
7. Consideraciones éticas.	48
8. Consideraciones financieras.	49
9. Resultados.	50
10. Discusión.	67
11. Conclusiones.	74
12. Referencias.	75

<b>Figuras</b>	<b>Página</b>
Figura 1.	25
Figura 2.	37
Figura 3.	52
Figura 4.	54
Figura 5.	55
Figura 6.	56
Figura 7.	57
Figura 8	58
Figura 9.	61
Figura 10.	62
Figura 11	63
Figura 12	64
Figura 13	65

### **Tablas**

Tabla 1.	11
Tabla 2.	20
Tabla 3.	51
Tabla 4.	53
Tabla 5.	57
Tabla 6.	59
Tabla 7	66

## V. LISTA DE ABREVIATURAS

OMS: Organización Mundial de la Salud.

IDH: isocitrato deshidrogenasa.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

FISH: fluorescencia por hibridación *in situ*.

*ATRX*: alfa-talasemia/retraso mental ligado a X.

NOS: no especificado.

*MGMT*: O6-metilguanina-DNA metil transferasa.

HR: *hazard ratio*.

MS-PCR: reacción en cadena de la polimerasa metilación específica.

KPS: *Karnofsky Performance Scale*.

FLAIR: *Fluid-attenuation Inversion Recovery*.

EOR: extensión de la resección.

GTR: resección total (100%).

STR: resección subtotal (90<100%).

PR: resección parcial (<90%).

RR: riesgo relativo.

NNT: número necesario a tratar.

OS: sobrevida global.

PFS: periodo libre de progresión.

NCCN: *National Comprehensive Cancer Network*.

PCV: Procarbazina-Lomustina-Vincristina.

RANO: *Response assessment in Neuro-Oncology*.

IC: intervalo de confianza.

EANO: *European Association for Neuro-Oncology*.

GSC: células madre de gliomas.

CSC: células madre de cáncer.

NSC: células madre neurales.

SVZ: zona subventricular.

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa.

SOX: *Sex-determining Region Y box*.

TAC+cte: tomografía axial computarizada con contraste.

IRM+gd: resonancia magnética con gadolinio.

IQR: rango intercuartil

DE: desviación estándar

BEX1: *Brain expressed X-linked 1*

BEX2: *Brain expressed X-linked 2*

## 1) ANTECEDENTES

Los tumores cerebrales son clasificados como primarios, o secundarios. Los primarios son aquellos que se originan en el encéfalo, mientras que los secundarios provienen de otros sitios, como el pulmón o la próstata, y se diseminan a éste. Los tumores primarios cerebrales se subclasifican de acuerdo con la estirpe celular (glial o neuronal) de la cual provienen, por ejemplo: gangliocitomas si provienen de las neuronas; astrocitomas si provienen de los astrocitos; oligodendrogliomas si se originan de los oligodendrocitos; ependimomas si se originan de las células ependimarias; entre otros. Los gliomas, término que se utiliza para agrupar los diferentes tipos de tumores de origen glial, representan el 30% de los tumores cerebrales primarios en adultos y son la neoplasia sólida más común y la segunda causa de muerte después de la leucemia en niños de 0-19 años de edad<sup>1</sup>.

La cuarta revisión de la clasificación de tumores del sistema nervioso central de la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha caracterizado los diferentes tipos de gliomas basada en una descripción histopatológica del tumor en cuatro grados: I, tumores con baja capacidad de proliferación y posibilidad de cura con el tratamiento quirúrgico; grado II, infiltración difusa, alto grado de diferenciación celular, riesgo de recurrencia a pesar de su baja actividad proliferativa y progresión a otros grados; grado III, anaplasia, atipia nuclear, hiper celularidad, actividad mitótica proliferativa y mayor riesgo de transformación a grado IV; y grado IV atipia nuclear, pleomorfismo celular, actividad mitótica, con proliferación vascular y necrosis<sup>2</sup>.

Recientemente, se ha añadido la identificación de marcadores moleculares a la caracterización histopatológica de los gliomas, con la finalidad de incrementar la precisión diagnóstica, mejorar el tratamiento de los pacientes y hacer correlación con el pronóstico<sup>3</sup> (ver **Tabla 1**).

**Tabla 1. Clasificación histopatológica y molecular de gliomas.**

Clasificación	Grado	Marcadores genéticos
<i>Tumores de origen astrocítico</i>		
Astrocitoma pilocítico	I	No mutación <i>IDH1/2</i> , mutación <i>BRAF</i>
Astrocitoma difuso, <i>IDH</i> mutado	II	Mutación <i>IDH1/2<sup>b</sup></i> , <i>TP53</i> y <i>ATRX</i> ( <i>ATRX</i> perdido <sup>c</sup> )
Astrocitoma difuso, <i>IDH</i> nativo	II	No mutación <i>IDH1/2</i>
Astrocitoma anaplásico, <i>IDH</i> mutado	III	Mutación <i>IDH1/2<sup>b</sup></i> , <i>TP53</i> y <i>ATRX</i> ( <i>ATRX</i> perdido <sup>c</sup> )
Astrocitoma anaplásico, <i>IDH</i> nativo	III	No mutación <i>IDH1/2</i>
Glioblastoma, <i>IDH</i> mutado	IV	Mutación <i>IDH1/2<sup>b</sup></i> , <i>TP53</i> y <i>ATRX</i> ( <i>ATRX</i> perdido <sup>c</sup> )
Glioblastoma, <i>IDH</i> nativo	IV	No mutación <i>IDH1/2</i>
Glioblastoma, NOS <sup>a</sup>	IV	Análisis genético inconcluso o no realizado
<i>Tumores de origen oligodendroglial</i>		
Oligodendroglioma, <i>IDH</i> mutado, 1p/19q co-delecionado	II	Mutación <i>IDH1/2<sup>b</sup></i> , promotor <i>TERT</i> , codelección 1p/19q <sup>b</sup> . No mutación <i>ATRX</i> ( <i>ATRX</i> conservado <sup>c</sup> ).
Oligodendroglioma, NOS <sup>a</sup>	II	Análisis genético inconcluso o no realizado
Oligoastrocitoma, NOS <sup>a</sup>	II	Análisis genético inconcluso o no realizado
Oligodendroglioma anaplásico, <i>IDH</i> mutado, 1p/19q co-delecionado	III	Mutación <i>IDH1/2<sup>b</sup></i> , promotor <i>TERT</i> , codelección 1p/19q <sup>b</sup> . No mutación <i>ATRX</i> ( <i>ATRX</i> conservado <sup>c</sup> ).
Oligodendroglioma anaplásico, NOS <sup>a</sup>	III	Análisis genético inconcluso o no realizado
Oligoastrocitoma anaplásico, NOS <sup>a</sup>	III	Análisis genético inconcluso o no realizado

<sup>a</sup>NOS: No especificado, por sus siglas en inglés.

<sup>b</sup>Marcador necesario para clasificar la lesión dentro del diagnóstico.

<sup>c</sup>Mediante técnica de inmunohistoquímica.

Basado en: Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2016;131(6):803-820. doi:10.1007/s00401-016-1545-1

Históricamente, las lesiones definidas como gliomas de bajo grado, comprendían a los astrocitomas, oligodendrogliomas y oligoastrocitomas y se clasificaban como lesiones grado II y grado III. Sin embargo, en el compartamiento clínico de dichas lesiones, existían diferencias importantes en relación a la supervivencia, a la posibilidad de transformación hacia una lesión grado IV con el tiempo y en la respuesta al

tratamiento. Debido a la gran variabilidad inter-observador para el diagnóstico de los gliomas de bajo grado y a la falta de correlación de dicha clasificación con el pronóstico y comportamiento clínico, se profundizó en el estudio de la enzima isocitrato deshidrogenasa (IDH), presente en el ciclo de Krebs, que una vez mutada permite la formación aberrante de D-2-hidroxiglutarato, oncometabolito responsable de cambios epigenéticos en las células afectadas<sup>4</sup>. La demostración por inmunohistoquímica de la mutación de IDH1 (p.R132H) e IDH2 (p.R172H), mutaciones más frecuentemente identificadas, permiten la caracterización del comportamiento clínico de los gliomas de bajo grado en dos categorías<sup>5</sup>.

- Astrocitomas IDH mutados

En esta categoría se encuentra el astrocitoma difuso, grado II; el astrocitoma anaplásico, grado III y el glioblastoma, grado IV, quienes en conjunto muestran un mejor pronóstico caracterizado por un aumento en la sobrevida en comparación con aquellos IDH nativos y una menor edad de presentación. El astrocitoma difuso grado II se observa frecuentemente en adultos jóvenes, alrededor de los 35 años y cuenta con una sobrevida aproximada de 11 años. Dentro de esta categoría se encuentra el astrocitoma gemistocítico, conformado por gemistocitos o células grandes, de aspecto globoso. El astrocitoma anaplásico grado III, cuenta una sobrevida de 9 años, mayor a la descrita para todos los astrocitomas anaplásicos con IDH mutada y no mutada (2 años)<sup>6</sup>. Finalmente, el glioblastoma grado IV, conforma el 10% de todos los glioblastomas, se presenta en pacientes alrededor de los 45 años de edad, se caracteriza por una menor cantidad de necrosis y se asocia a una sobrevida de 27 meses, en comparación con los 11 meses reportados para glioblastomas IDH nativos<sup>7</sup>.

- Astrocitomas IDH nativos

En este subgrupo se encuentran el astrocitoma difuso grado II, anaplásico grado III y el glioblastoma grado IV. Se caracterizan por mostrar una menor sobrevida y mayor edad al momento del diagnóstico<sup>5</sup>. Dentro del primer subtipo se sitúa el astrocitoma difuso grado II IDH nativo, poco frecuente, y cuyo diagnóstico se confirma una vez que el resultado de otros marcadores genéticos (ver abajo *TP53/ATRX* y codelección 1p/19q) es negativo. Se han descrito que lesiones con estas características genóticas pueden manifestar un patrón de crecimiento denominado *gliomatosis cerebri*, caracterizado por presentarse en al menos tres lóbulos cerebrales y de forma simultánea, en el compartimiento supra e infratentorial<sup>3</sup>. Los astrocitomas anaplásicos grado III, corresponden al 20% de los anaplásicos y se asemejan histopatológicamente y en su comportamiento clínico agresivo, a los glioblastomas grado IV IDH nativos<sup>6</sup>. Por último, los glioblastomas grado IV o también llamados glioblastomas primarios, son los más frecuentemente encontrados, corresponden al 90% de los glioblastomas y su sobrevida es menor en comparación a los glioblastomas IDH mutados o secundarios<sup>7</sup>. En caso de presentarse en la línea media se denominan astrocitomas difusos de línea media Histone3 K27M-mutados<sup>3</sup>.

Existen diversos métodos para la identificación de la mutación en la proteína IDH (IDH1 e IDH2), entre ellos se encuentra la inmunohistoquímica; diversas técnicas de secuenciación génica; y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) alelo-específica. En caso de resultar negativa la identificación de la mutación IDH mediante inmunohistoquímica, se sugiere la secuenciación del codón 132 para IDH1 y 172 para IDH2, debido a que en un 25% para los gliomas grado II y un 12.5% para los gliomas grado III, pueden encontrarse mutaciones menos frecuentes que también sirven para establecer diagnóstico y pronóstico<sup>8</sup>. Es importante mencionar que los astrocitomas pilocíticos grado I por definición no presentan mutación IDH<sup>14</sup>.

Se ha descrito la codeleción 1p/19q como un marcador que caracteriza a los tumores oligodendrogliales, toda vez que estos presenten características histopatológicas sugestivas, como el aspecto celular en forma de “huevo estrellado” y presenten de forma conjunta la mutación IDH<sup>3</sup>. El oligodendroglioma IDH mutado 1p/19q co-deleciónado puede presentarse con un grado histopatológico II o III, en caso de presentar características celulares como pleomorfismo, elevado índice mitótico o proliferación vascular y ambos se caracterizan por presentar una sobrevida aproximada de 13 años. La codeleción 1p/19q también se ha descrito como un factor que predice una buena respuesta al tratamiento. El diagnóstico se realiza con la técnica de hibridación fluorescente *in-situ* (FISH, por sus siglas en inglés) o PCR<sup>9</sup>.

La mutación del gen *ATRX* (alfa talasemia/retraso mental ligado a X, por sus siglas en inglés), identificada mediante secuenciación, implica la pérdida de función de una proteína reguladora de la cromatina, lo cual permite un alargamiento anormal de los telómeros<sup>10</sup>. Esta mutación se observa en la mayoría de los astrocitomas IDH mutados, y debido a que su identificación es mutuamente excluyente con la presencia de la codeleción 1p/19q, permite diferenciar estos de los oligodendrogliomas IDH mutados 1p/19q co-deleciónados<sup>11</sup>. Debido a que la mutación es inactivadora, pacientes mutados no mostrarán positividad al transcrito *ATRX* mediante inmunohistoquímica (*ATRX* perdido)<sup>12</sup>. La mutación *TP53* frecuentemente se identifica en conjunto con la mutación de *ATRX*<sup>5</sup>.

El término “no especificado” (NOS, por sus siglas en inglés), se reserva para aquellos gliomas en donde no es posible realizar o completar el diagnóstico molecular, o bien, es inconcluso. El término más que definir un comportamiento clínico definido se utiliza para representar aquellos casos de los que no se sabe lo suficiente respecto a su comportamiento patológico, genético o clínico y requiere estudios adicionales<sup>3</sup>.

Otro marcador molecular importante para determinar la respuesta al tratamiento es el grado de metilación del promotor del gen *MGMT*, que da origen a la enzima O6-metilguanina-DNA metil transferasa, encargada de la reparación del DNA posterior al tratamiento con alquilantes. Si el promotor se encuentra metilado, es decir inactivado, no habrá reparación del DNA y por lo tanto traducirá una mayor respuesta a la quimioterapia con temozolomide, mejoría en periodo libre de progresión (*hazard ratio* [HR] 0.56, 95% CI 0.32-0.80) y en la supervivencia (HR 0.50, 95% CI 0.35-0.66). Es importante mencionar que su identificación requiere la realización de ensayos cualitativos o cuantitativos, como la pirosecuenciación, PCR metilación-específica (MS-PCR por sus siglas en inglés) o secuenciación por bisulfito en tejido fresco<sup>13</sup>.

La presentación clínica de los gliomas suele manifestarse con signos y síntomas progresivos que evolucionan en días o semanas y dependen de la localización y tamaño de la lesión que los genera. Los síntomas principales son: cefalea, predominantemente observada en lesiones de alto grado, lo que se explica por un crecimiento más rápido y por ende un incremento de la presión intracraneal; crisis convulsivas, predominantemente observada en lesiones de bajo grado; alteraciones cognitivas como pérdida de la memoria; y otros déficit focales. De acuerdo a lo reportado por Chang y cols.<sup>14</sup>, que describió de manera prospectiva el diagnóstico, tratamiento, evolución y seguimiento de 788 pacientes con diagnóstico de gliomas grado III y IV, aquellos pacientes con diagnóstico de glioblastoma mostraron un peor estado funcional medido a través de la escala de Karnofsky (KPS, por sus siglas en inglés)<sup>15</sup> al momento del diagnóstico en comparación con los pacientes con diagnóstico de astrocitoma anaplásico.

El diagnóstico presuntivo se realiza mediante la realización de un estudio de imagen como la resonancia magnética, o bien una tomografía axial computarizada con contraste, en quienes está contraindicado exponerse a un campo magnético por

indicación médica. Las lesiones de bajo grado (grado II) tradicionalmente se describen como lesiones infiltrantes, hipointensas en T1, hiperintensas en T2, con edema perilesional digitiforme identificado como un aumento de la señal en la secuencia FLAIR (*Fluid-Attenuated Inversion Recovery*). Las lesiones de alto grado (grado III y IV) se caracterizan por mostrar un realce heterogéneo al contraste, observándose un reforzamiento anular con un centro hipointenso característico de lesiones con necrosis presente, como es el caso de los glioblastomas. A diferencia de las lesiones de alto grado, las de bajo grado no presentan reforzamiento tras la administración de gadolinio. Hasta en un 4.1% de los casos pueden observarse lesiones bilaterales al momento del diagnóstico<sup>14</sup>.

Otros hallazgos radiológicos como el contacto tumoral con la zona ventricular-subventricular, definida como un área de reforzamiento focal en dicha zona, o bien, un incremento en la señal en secuencia T2 en pacientes con diagnóstico de glioblastoma, ha sido correlacionada con una menor sobrevida, recurrencias tumorales tempranas e incluso con mayor probabilidad de lesiones simultáneas<sup>16</sup>.

Una vez realizado el diagnóstico presuntivo de un glioma, es preciso realizar la confirmación histopatológica del tumor. Las características clínicas del paciente, KPS preoperatorio, la localización, tamaño tumoral y la sospecha del grado de malignidad orientan la estrategia más adecuada para el tratamiento quirúrgico. Toda vez que sea posible, se buscará la resección máxima segura de la lesión, es decir, la mayor extensión de la resección posible preservando la función, sin embargo existen situaciones como en el caso de lesiones múltiples, profundas o en áreas elocuentes donde solo es posible la confirmación histopatológica mediante una biopsia o bien una resección parcial<sup>14</sup>.

La extensión de la resección (EOR, por sus siglas en inglés), calculado como el producto del cociente del volumen tumoral postoperatorio entre el volumen tumoral preoperatorio por cien, se clasifica como resección total (GTR por sus siglas en inglés,  $\geq 100\%$ ), resección subtotal (STR,  $\geq 90\% < 100\%$ ) y resección parcial (PR,  $< 90\%$ ). Se ha demostrado que GTR y STR en comparación con biopsia, reducen la mortalidad a 1 (Riesgo Relativo [RR], 0.77; 95%CI, 0.71-0.84;  $P < .001$ ; Número Necesario a tratar [NNT], 21) y 2 años (RR, 0.94; 95%CI, 0.89-1.00;  $P = .04$ ; NNT, 593) en pacientes con glioblastoma<sup>17</sup>. Resecciones mayores a 70% y volumen tumoral residual menor a 5 cc incrementan la sobrevida global (OS, por sus siglas en inglés) y aumentan el periodo libre de progresión (PFS, por sus siglas en inglés)<sup>18</sup>. En el caso de pacientes con diagnóstico de glioma de bajo grado, se demostró mediante un análisis retrospectivo que aquéllos en quienes se realizó un EOR mayor a 90% mostraron un OS de 97% y 91% a los 5 y 8 años, respectivamente, en comparación con aquéllos en quienes se logró una resección menor a 90%, donde la OS fue de 16% y 60% a los 5 y 8 años, respectivamente. La EOR fue un factor pronóstico relacionado al periodo libre de progresión hacia lesión con mayor grado de malignidad (HR, 0.983; 95% CI, 0.972-0.995;  $P = 0.005$ )<sup>19</sup>.

Para establecer la extensión de la resección se recomienda la realización de una resonancia magnética con gadolínico dentro de las primeras 24-48 horas, o a más tardar a las 72 horas del post-quirúrgico, debido a que después de las 72 horas puede evidenciarse un incremento en el realce del contraste de la pared de la cavidad quirúrgica asociado al procedimiento que pudiera dificultar la distinción con tumor residual<sup>20</sup>.

Avances tecnológicos transoperatorios han sido incorporados al arsenal quirúrgico para favorecer una resección máxima segura como el uso de fluorescencia intraoperatoria, mapeo cortico-subcortical, monitorización neurofisiológica, resonancia

magnética intraoperatoria, sistemas de neuronavegación, craneotomías con paciente despierto, sin embargo, las mejoras en la supervivencia global o el periodo libre de progresión han sido modestas<sup>21</sup>.

Las guías de la *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) para las neoplasias del sistema nervioso central en su versión 2018<sup>22</sup>, establecen los algoritmos terapéuticos para la atención oncológica multidisciplinaria de los gliomas de acuerdo a su grado histopatológico, extensión de la resección (GTR vs STR), edad, KPS, marcadores genéticos, etc. El tratamiento estándar para gliomas grado II busca alcanzar una resección GTR, y en aquellos pacientes con gliomas grado II de alto riesgo (mayores de 40 años, déficit neurológico preoperatorio, tiempo de inicio de síntomas menor a 30 semanas, diámetro tumoral preoperatorio mayor a 5 cm, tumor cruzando la línea media, histología astrocítica y STR<sup>23</sup>) radioterapia fraccionada (45-54 Gy en fracciones de 1.8-2 Gy más márgenes de 1-2 cm); quimioterapia adyuvante con 6 ciclos de PCV (Procarbazona-Lomustina-Vincristina, por sus siglas en inglés) o 12 ciclos de temozolomida 75 mg/m<sup>2</sup> concurrente y/o adyuvante. En pacientes de bajo riesgo la quimioterapia con PCV o temozolomida es suficiente.

En un estudio clínico aleatorizado que buscó definir el tiempo de inicio del tratamiento, con un seguimiento de 8 años, se demostró que, si bien la radioterapia administrada a pacientes con gliomas de bajo grado de forma temprana después de la cirugía aumentó el PFS en comparación con el grupo control, donde la radioterapia se inició hasta la progresión (5.4 vs 3.7 años), no se evidenciaron diferencias entre grupos respecto a la OS. Debido a los efectos adversos, retrasar la radioterapia en pacientes que se encuentren en buenas condiciones clínicas después de la cirugía puede ser una alternativa razonable<sup>24</sup>.

En el caso de lesiones de alto grado está indicada la radioterapia fraccionada (60 Gy con fracciones de 1.8-2 Gy más márgenes de 1-2 cm para lesiones grado III o 2-2.5 para lesiones grado IV); más PCV neoadyuvante o adyuvante o temozolomide concurrente y/o adyuvante; o neoadyuvante/adyuvante para gliomas grado III; o temozolomide concurrente y adyuvante para lesiones grado IV. Pacientes con diagnóstico de glioblastoma mayores de 70 años con pobre estado funcional (KPS <60) pueden recibir radioterapia hipofraccionada (5,10,15 o 20 fracciones) o temozolomide o cuidados paliativos<sup>22</sup>.

La resección completa es curativa en los pacientes con astrocitoma pilocítico y debe ser la estrategia inicial de tratamiento. La radioterapia se reserva a aquellos pacientes en donde realizar una cirugía no es factible o en quienes presentan progresión tumoral, en cuyo caso se sugiere administrar 54 Gy de manera fraccionada<sup>25</sup>.

El seguimiento por imagen para los gliomas grado I/II debe realizarse cada 3-6 meses durante los primeros 5 años y posteriormente cada año. En el caso de los gliomas grado III/IV cada 2-4 meses durante 3 años y posteriormente cada 6 meses<sup>22</sup>.

Para describir adecuadamente la respuesta al tratamiento es necesario obtener información clínica, como el deterioro o mejoría en el examen neurológico o el uso de corticosteroides, y combinarla con hallazgos radiológicos, como el incremento en el tamaño tumoral, el realce al contraste, la presencia de nuevas lesiones o la intensidad de señal en secuencias T2 o FLAIR, etc. Esto objetiviza la información, permite comparaciones respecto a un basal para el seguimiento radiológico de determinado paciente y da homogeneidad y reproducibilidad a los resultados de estudios clínicos. Esta información en conjunto forma parte de los criterios RANO (*Response assessment in Neuro-Oncology*) y permite clasificar la respuesta al tratamiento en:

respuesta parcial, respuesta completa, enfermedad estable y progresión<sup>20</sup> (Ver **Tabla 2**).

Tabla 2. Criterios RANO de respuesta al tratamiento				
Criterio	Respuesta completa <sup>b</sup>	Respuesta parcial <sup>b</sup>	Enfermedad estable	Progresión <sup>b,c</sup>
Lesión en T1-gadolinio <sup>a</sup>	Ninguna	Disminución $\geq 50\%$	Disminución $< 50\%$ pero $> 25\%$	Incremento $\geq 25\%$
T2/FLAIR <sup>a</sup>	Estable o disminución	Estable o disminución	Estable o disminución	Incremento
Nueva lesión	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Presente
Corticosteroides	No o en sustitución fisiológica	Sin cambios o en disminución	Sin cambios o en disminución	No aplica
Estado clínico	Estable o mejoría	Estable o mejoría	Estable o mejoría	Deterioro
Criterios para establecer respuesta	Todos	Todos	Todos	Cualquiera

<sup>a</sup> Lesión cuantificada como el producto de dos ejes transversales en mm, perpendiculares entre sí, en lesiones medibles (mayores de 10 mm, presentes en dos cortes consecutivos no mayores a 5 mm) en comparación con una resonancia magnética basal idealmente realizada dentro de las primeras 72 horas de la cirugía. Pacientes con lesiones no medibles solo podrán categorizarse como enfermedad estable.

<sup>b</sup> Considerar criterios de pseudoprogresión y pseudorrespuesta

<sup>c</sup> Lesión cuantificada como el producto de dos ejes transversales en mm, perpendiculares entre sí, en lesiones medibles (mayores de 10 mm, presentes en dos cortes consecutivos no mayores a 5 mm) en comparación con una resonancia magnética basal donde se haya realizado la menor medición del tumor o en comparación con la mejor respuesta obtenida

Basado en: Wen PY, Macdonald DR, Reardon DA, et al. Updated Response Assessment Criteria for High-Grade Gliomas: Response Assessment in Neuro-Oncology Working Group. *J Clin Oncol.* 2010;28(11):1963-1972. doi:10.1200/JCO.2009.26.3541

Existen algunas condiciones que influyen en el diagnóstico radiológico y que es importante considerarlas a fin de obtener resultados confiables. La pseudoprogresión es un fenómeno radiológico que se observa en un 20-30% de los pacientes dentro de las 12 semanas posteriores a haber recibido tratamiento con quimio/radioterapia. Esto

se debe a un incremento transitorio en la permeabilidad capilar tumoral y puede ser mal diagnosticado como progresión<sup>26</sup>. Durante este periodo, el diagnóstico de progresión solo puede realizarse cuando exista una nueva lesión o un incremento en el realce al contraste fuera del área irradiada o bien, si se confirmó histopatológicamente la presencia de tumor posterior a una reintervención quirúrgica<sup>20</sup>. Otros factores que permiten esta distinción son la presencia de síntomas clínicos<sup>27</sup> y el estado no metilado de la *MGMT*<sup>28</sup>.

La pseudorrespuesta, en cambio, se caracteriza por una disminución en el realce al contraste asociado al uso de anti-angiogénicos, como el bevacizumab, puede observarse 1 ó 2 días posterior al tratamiento y puede mal diagnosticarse como respuesta completa o parcial. Si bien el uso de anti-angiogénicos ha traducido una adecuada respuesta radiológica y un incremento en la PFS, ésta no se ha acompañado de un incremento significativo en la OS<sup>29</sup>.

En el caso de gliomas grado II y III que muestran lesión sin realce al contraste, la distinción entre recurrencia tumoral y edema asociado al tratamiento (por ejemplo la radiación), es difícil y actualmente no existe un método confiable para hacer dicha distinción. La correlación clínica, la presencia de infiltración cortical, efecto de masa o el crecimiento tumoral fuera del margen de radiación ayudará a establecer el diagnóstico de progresión<sup>20</sup>.

La presencia de múltiples lesiones puede afectar la valoración radiológica. La medición es realizada en un mínimo de 2 lesiones y un máximo de 5, que muestren crecimiento en estudios seriados<sup>20</sup>.

La sobrevida libre de progresión, o el periodo comprendido entre el inicio del tratamiento y el diagnóstico de progresión (o recurrencia), y la sobrevida global, o el periodo comprendido entre el diagnóstico y la muerte, son variables de desenlace

clínicas que se utilizan en estudios clínicos para objetivizar y reflejar los beneficios de determinadas intervenciones sobre una patología<sup>30</sup>. Los factores pronósticos, en cambio, son situaciones, afectaciones o características del paciente que pueden usarse para calcular la probabilidad de recuperación de una enfermedad o la probabilidad de que la enfermedad recidive<sup>31</sup>, y por ende, impactar en el PFS y/o la OS. Como hemos mencionado anteriormente, la edad, sexo, estado KPS, clínica neurológica y tiempo del inicio de los síntomas, diámetro tumoral preoperatorio, EOR, grado histopatológico, marcadores genéticos (IDH, *MGMT*, codeleción 1p/19q, etc), son factores pronósticos que influyen en el PFS y la OS<sup>1,7-9,11,13,17,21,25,32,33</sup>.

A pesar del beneficio ofrecido por el tratamiento quirúrgico y adyuvante con quimioterapia y radioterapia en la sobrevida, la recurrencia tumoral es la regla en los gliomas. Las sobrevidas reportadas entre los distintos grados tumorales varían ampliamente. El comportamiento benigno de un astrocitoma pilocítico traduce una sobrevida de 94.2% a 5 años (Intervalo de confianza [IC] 95%, 93.3-95.0) mientras que el comportamiento agresivo de un astrocitoma anaplásico o un glioblastoma determina pobres sobrevidas a 3 años, a saber, 35.7% (IC 95%, 34.1-37.3) y 8.8% (IC 95%, 8.5-9.2), respectivamente<sup>1</sup>. Debido a que no existe tratamiento curativo para esta enfermedad, la decisión de tratar a un paciente con recurrencia o progresión tumoral es una medida paliativa y debe individualizarse, de tal modo que se pueda balancear el beneficio en el control tumoral y la mejoría clínica respecto a la calidad de vida. Diversos factores pronósticos se han asociado con una buena respuesta al tratamiento en gliomas recurrentes, mismos que han ayudado a determinar que pacientes se beneficiarían del tratamiento de segunda línea.

En un estudio retrospectivo de 141 pacientes con diagnóstico de glioblastoma recurrente que comparó a pacientes que se sometieron a una reintervención quirúrgica contra pacientes que recibieron tratamiento no quirúrgico, factores como

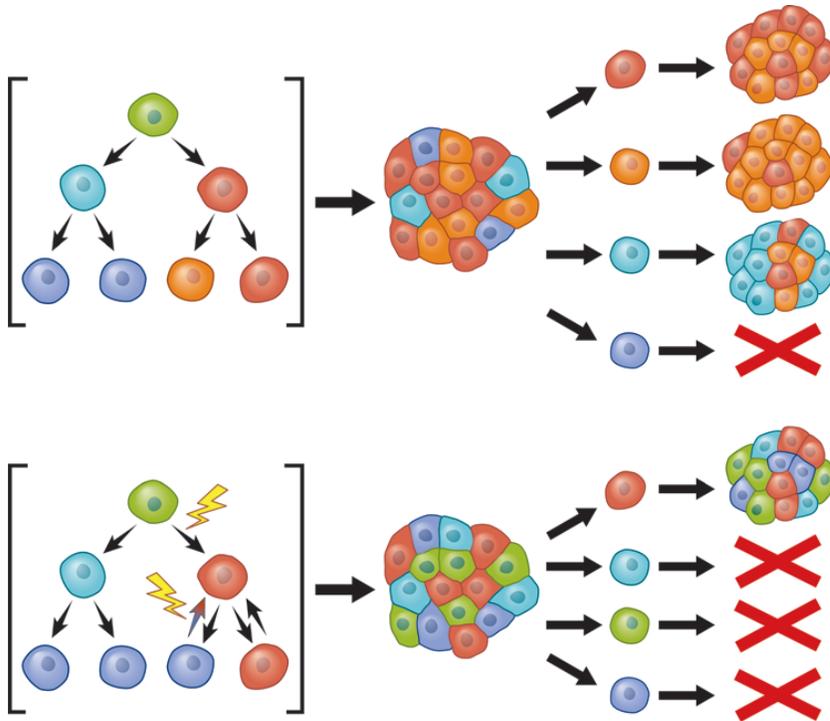
una edad menor, mayor volumen tumoral, KPS >70 y menos comorbilidades mostraron ser factores asociados con un mejor pronóstico. La supervivencia global entre pacientes no intervenidos en comparación con pacientes intervenidos quirúrgicamente mostró diferencias estadísticamente significativas y fue de 13 vs 19 meses ( $p=0.002$ ), respectivamente<sup>34</sup>.

De acuerdo a las guías de la *European Association for Neuro-Oncology* (EANO) la reintervención quirúrgica se indica en un 20-30% de los pacientes con gliomas recurrentes y se reserva para aquellos pacientes de menor edad, mejor KPS, un patrón de progresión localizado, lesiones circunscritas y sintomáticas con un intervalo al menos de 6 meses después de la primera cirugía, o bien, en aquellos que muestran una progresión temprana sintomática asociada a una primera resección inadecuada. La radioterapia y/o quimioterapia deberá ofrecerse toda vez que el paciente no la haya recibido posterior a la primer intervención<sup>35</sup>.

De acuerdo a las guías de la NCCN, el tratamiento médico en pacientes con recurrencia tumoral en gliomas de bajo grado (II) con lesiones no resecables sin antecedente de radioterapia contempla biopsia para determinar el status de la IDH y la presencia o ausencia de la codeleción 1p/19q; quimio-radioterapia en un protocolo similar al administrado en pacientes de alto riesgo (ver arriba); o quimioterapia sola (temozolomide o lomustina/carmustina o PCV o cisplatino/carboplatino); o radioterapia fraccionada sola. La re-irradiación se reserva a pacientes con más de 2 años de PFS posterior a la radioterapia, o aquellos que muestren recurrencia fuera del margen de tratamiento previo. En el caso de pacientes con recurrencia tumoral en gliomas de alto grado (III-IV) con lesiones no resecables están indicados regímenes de quimioterapia de segunda línea o re-irradiación (ver arriba) o cuidados paliativos<sup>22</sup>.

Se han descrito poblaciones celulares extraídas a partir de gliomas en adultos con la capacidad de generar células tumorales *in vitro*, o gliomagénesis, denominadas Células Madre en Gliomas (GSC, por sus siglas en inglés)<sup>36</sup>. La definición de GSC pertenece al concepto genérico de Células Madre en el Cáncer (CSC, por sus siglas en inglés) e incluye su capacidad oncogénica en el huésped o en tejidos receptores inmunosuprimidos xenotransplantados y su capacidad de proliferar, auto-renovarse y diferenciarse a poblaciones celulares heterogéneas que conforman los tumores sólidos<sup>37</sup>. Este modelo de crecimiento tumoral se interrelaciona en grados variables con el concepto estocástico clásico de tumorigénesis, donde la proliferación se debe al resultado último de la acumulación gradual de diversos cambios genéticos en una clona celular <sup>38,39</sup> (Ver **Figura 1**).

Existen en el cerebro adulto grupos celulares denominados Células Madre Neurales (NSC, por sus siglas en inglés) localizados en la zona subventricular (SVZ, por sus siglas en inglés) y en la zona subgranular del giro dentado. Se cree que derivan de la glía radial, población celular encargada de la proliferación y migración celular durante neurodesarrollo y que en el sistema nervioso central adulto tienen la capacidad de regenerar nuevas neuronas y células gliales. Las similitudes en cuanto a la expresión de marcadores celulares, vías de señalización y características genotípicas entre las GSC y NSC han permitido hipotetizar que las GSC son variaciones malignas de las NSC<sup>40</sup>. Se ha descrito la posibilidad de que las GSC sean responsables de la resistencia al tratamiento así como de la progresión y recurrencia en pacientes con glioblastoma a pesar del tratamiento convencional<sup>41</sup>.



**Figura 1. Arriba:** Modelo estocástico que sugiere que el crecimiento tumoral se realiza a través de una evolución clonal de mutaciones adquiridas y que cada clona posee niveles comparables de oncogenicidad. **Abajo:** El modelo de *Cancer Stem Cells* (CSC) sugiere que existe una población de células con capacidad de autorrenovarse, de iniciar, propagar y mantener la tumorigénesis. Las CSC pueden originarse de un progenitor mutado o de una célula de cierto linaje que se desdiferenció y adquirió propiedades *stem-like*.

Traducido de: Sundar SJ, Hsieh JK, Manjila S, Lathia JD, Sloan A. The role of cancer stem cells in glioblastoma. *Neurosurg Focus*. 2014;37(6):E6.

Dentro de los marcadores que caracterizan ambas poblaciones celulares, CD133, que normalmente se expresa durante el desarrollo embrionario, se identifica en células tumorales aisladas a partir de astrocitomas y permite la formación de tumor fenotípicamente similar *in vitro*<sup>42</sup>. El marcaje conjunto mediante inmunohistoquímica de Nestina, marcador de NSC, y CD 133 en tumores gliales ha mostrado una mayor expresión conforme incrementa el grado histopatológico y en aquellos pacientes CD133+/Nestina+ se evidenció una menor OS, contrario a lo encontrado en aquellos pacientes con una menor expresión de dichos marcadores<sup>43</sup>. En cultivos celulares obtenidos a partir de muestras de glioblastomas, el estudio de las poblaciones CD133 positivas mostraron un incremento significativo en la expresión de SOX2 cuantificada

por PCR-transcriptasa inversa (RT-PCR, por sus siglas en inglés) e inmunofluorescencia, un mayor porcentaje de supervivencia celular posterior a tratamiento con cisplatino y una mayor capacidad de formación de colonias después del tratamiento con radiación ionizante (2Gy) en comparación con poblaciones CD133 negativas<sup>41</sup>.

Los factores de transcripción SOX1 y SOX2 (*Sex-determining Region Y box*), pertenecientes al subgrupo SOXB1, se expresan en el neuroepitelio durante el desarrollo embrionario del sistema nervioso<sup>44</sup> y permiten que las células del ectodermo adquieran un destino hacia la diferenciación en precursores neurales<sup>45</sup>. SOX1 es uno de los primeros factores de transcripción en expresarse para dicho propósito y a su vez induce la expresión de Nestina<sup>46</sup>. La expresión de ambos marcadores se ha asociado al mantenimiento de las GSC *in vitro*<sup>41,47</sup>. En muestras tisulares de astrocitomas de bajo grado no se evidenció una mayor expresión de SOX1 en comparación con muestras de tejido normal. Por el contrario, en muestras de pacientes con glioblastoma, si bien la expresión de SOX1 fue heterogénea, se evidenció una correlación inversa entre la expresión de SOX1 y la OS, lo cual traduce que en ciertas subpoblaciones SOX1 es un factor asociado con un mal pronóstico clínico<sup>48</sup>.

De igual modo, la expresión de SOX2 se ha identificado en GSC obtenidas a partir de glioblastomas en adultos y se ha correlacionado con un fenotipo invasor, oncogénico, con capacidad de propagación y autorenovación y con un peor pronóstico clínico<sup>49,50</sup>. En un estudio de cultivos celulares obtenidos a partir de muestras de glioblastoma, 13 de 20 muestras fueron capaces de generar GSC inmunopositivas a CD133/SOX2/Nestina en un lapso entre 10 y 30 días, y en 10 de ellas esto coincidió con una expresión de Ki67, marcador de proliferación celular, mayor a 5%. La capacidad de generar GSC, asociada a una expresión de SOX2 > 30%, así como la

presencia de Ki67 (GSC+/Ki67+) se asoció con una menor PFS y OS en comparación con cultivos celulares sin dicha capacidad y con una expresión de Ki67<5%<sup>49</sup>. Por el contrario, la silenciación de SOX2 mediante RNA de interferencia administrado mediante un vector lentivírico en poblaciones celulares CD133 positivas *in vitro* de mostró una menor capacidad para formación de neuroesferas, una menor proliferación celular en medios de cultivo enriquecidos y una menor expresión de CD133<sup>41</sup>.

En un análisis de correlación entre la expresión de SOX1 y SOX2 se observó que 60% de las biopsias de glioblastoma con sobreexpresión de SOX2 mostraron niveles elevados de SOX1, mientras que las muestras con expresión moderada o baja de SOX2 se asociaron a menores niveles de SOX1, lo cual traduce que ambos podrían actuar en la misma vía de señalización<sup>48</sup>. Esto es consistente con el hecho de que factores de transcripción pertenecientes al mismo subgrupo génico manifiestan patrones de expresión similares, comparten características bioquímicas y realizan funciones sinergistas y redundantes, no así entre distintos subgrupos<sup>51</sup>.

También se ha descrito que SOX9, factor de transcripción perteneciente a la familia SOXE, participa en el desarrollo embrionario y su expresión en las células de la cresta neural permite que éstas se diferencien hacia distintos destinos no neuronales<sup>52</sup>. Su expresión es mayor en gliomas en comparación con el tejido normal, y al igual que SOX2, se correlaciona con el grado histopatológico de la clasificación de la OMS<sup>53,54</sup>. Su inhibición favorece la apoptosis en líneas celulares y el incremento en su expresión de forma ectópica permite que NSC adopten un perfil oncogénico<sup>55</sup>.

## 2) PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

### Pregunta primaria

- ¿En un análisis retrospectivo de pacientes adultos con diagnóstico histopatológico de glioma de cualquier grado realizado durante el año 2014, que hayan sido sometidos a una reintervención quirúrgica por progresión tumoral confirmada por histopatología en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Dr. Manuel Velasco Suárez”, existen diferencias entre tumores con mayor inmunopositividad a marcadores moleculares de células madre de gliomas (SOX1, SOX2, SOX9) en comparación con tumores con menor inmunopositividad, cuantificados en el tejido obtenido a partir de la primera cirugía, en relación al periodo libre de progresión y la sobrevida global?

### Preguntas secundarias

- ¿En un análisis retrospectivo de pacientes adultos con diagnóstico histopatológico de glioma de cualquier grado realizado durante el año 2014, que hayan sido sometidos a una reintervención quirúrgica por progresión tumoral confirmada por histopatología en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Dr. Manuel Velasco Suárez”, la inmunopositividad para marcadores moleculares de células madre de gliomas (SOX1, SOX2, SOX9) se modifica en el tejido obtenido a partir de la reintervención quirúrgica en comparación con el tejido obtenido a partir de la primera cirugía?
- ¿En un análisis retrospectivo de pacientes adultos con diagnóstico histopatológico de glioma de cualquier grado realizado durante el año 2014, que hayan sido sometidos a una reintervención quirúrgica por progresión tumoral confirmada por histopatología en el Instituto Nacional de Neurología y

Neurocirugía “Dr. Manuel Velasco Suárez”, existe correlación entre los niveles de inmunopositividad de marcadores moleculares de células madre de gliomas (SOX1, SOX2, SOX9) y el periodo libre de progresión o la sobrevida global?

- ¿En un análisis retrospectivo de pacientes adultos con diagnóstico histopatológico de glioma de cualquier grado realizado durante el año 2014, que hayan sido sometidos a una reintervención quirúrgica por progresión tumoral confirmada por histopatología en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Dr. Manuel Velasco Suárez”, existe relación entre los niveles de inmunopositividad de marcadores moleculares de células madre de gliomas (SOX1, SOX2, SOX9) y los perfiles genotípicos tumorales determinados por IDH1/2 y Ki67?

### 3) HIPÓTESIS

Hipótesis nula ( $H_0$ ):

- No existen diferencias entre tumores con mayor inmunopositividad a marcadores moleculares de células madre de gliomas (SOX1, SOX2, SOX9) en comparación con tumores con menor inmunopositividad, cuantificada en el tejido obtenido a partir de la primera cirugía, en relación al periodo libre de progresión y la sobrevida global de pacientes adultos con diagnóstico de glioma de cualquier grado histopatológico realizado durante el año 2014 y sometidos a una reintervención quirúrgica por progresión tumoral confirmada por histopatología en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Dr. Manuel Velasco Suárez.

Hipótesis alterna ( $H_1$ ):

- Existen diferencias entre tumores con mayor inmunopositividad a marcadores moleculares de células madre de gliomas (SOX1, SOX2, SOX9) en comparación con tumores con menor inmunopositividad, cuantificada en el tejido obtenido a partir de la primera cirugía, en relación al periodo libre de progresión y la sobrevida global de pacientes adultos con diagnóstico de glioma de cualquier grado histopatológico realizado durante el año 2014 y sometidos a una reintervención quirúrgica por progresión tumoral confirmada por histopatología en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Dr. Manuel Velasco Suárez.

#### 4) OBJETIVOS

Objetivo general:

- Describir las diferencias entre tumores con mayor inmunopositividad a marcadores moleculares de células madre de gliomas (SOX1, SOX2, SOX9) en comparación con tumores con menor inmunopositividad, cuantificada en el tejido obtenido a partir de la primera cirugía, en relación al periodo libre de progresión y la sobrevida global de pacientes adultos con diagnóstico histopatológico de glioma de cualquier grado realizado durante el año 2014 y sometidos a una reintervención quirúrgica por progresión tumoral confirmada por histopatología en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Dr. Manuel Velasco Suárez.

Objetivos específicos:

- Describir las variables demográficas, presentación clínica, KPS y características radiológicas prequirúrgicas antes de la primera cirugía y la reintervención quirúrgica.
- Describir la extensión de la resección posterior a la primera cirugía y a la reintervención quirúrgica.
- Describir la expresión de SOX1, SOX2, SOX9 en el tejido obtenido a partir de la primer cirugía y la reintervención quirúrgica y su relación con marcadores de proliferación celular (Ki67).
- Clasificar histopatológicamente el grado del tumor a partir del tejido obtenido de la primer cirugía y la reintervención quirúrgica.
- Clasificar el subtipo tumoral de acuerdo a IDH1 a partir del tejido obtenido de la primer cirugía y la reintervención quirúrgica.

- Describir la duración del periodo libre de progresión desde la fecha de primer cirugía y la recidiva por clínica y/o por imagen.
- Describir la sobrevida global desde el diagnóstico por imagen hasta la muerte o pérdida del seguimiento del paciente.
- Correlacionar la inmunopositividad de SOX1, SOX2, SOX9 con el periodo libre de progresión y la sobrevida global.
- Describir si la inmunopositividad de SOX1, SOX2, SOX9 se modifica entre la primer cirugía y la reintervención quirúrgica.

## 5) JUSTIFICACIÓN

Si bien el avance en el conocimiento del comportamiento molecular de los gliomas, su mejor caracterización diagnóstica, las mejoras en la técnica microquirúrgica y en la eficacia y seguridad de la quimio/radioterapia, se han acompañado de una mejoría en la sobrevida de los pacientes en las últimas dos décadas, hasta la fecha no se ha descrito un tratamiento curativo o una mejoría sustancial en la sobrevida o el periodo libre de progresión<sup>56</sup>. La información respecto al comportamiento de las GSC *in vivo* en las neoplasias gliales es escasa, sin embargo, comienza a obtener popularidad puesto que plantea un nuevo enfoque fisiopatológico que ofrece una caracterización más integral de acuerdo a las características genotípicas y fenotípicas de las poblaciones de GSC<sup>38</sup>. Específicamente, el grado de actividad de un nicho de GSC, analizado en función de la identificación de diversas proteínas y marcadores celulares como los que se pretenden cuantificar en este estudio, podría correlacionarse con la capacidad del tumor de proliferar, diseminarse e invadir y por ende modificar el tiempo en el que se presenta la recurrencia tumoral o bien, afectar la sobrevida global.

Existe escasa evidencia que respalde estas teorías o que describa el comportamiento de la expresión de marcadores de células stem (SOX1, SOX2, SOX9) en función del tiempo y del contexto clínico del paciente; si su expresión se modifica por variables clínicas, como la presencia o ausencia del tratamiento adyuvante con quimio/radioterapia o por el grado histopatológico de la OMS en las muestras de tejido; si existe correlación con hallazgos imagenológicos, como el contacto con la zona periventricular; si existe una correlación con la mutación IDH1/2 o el grado de expresión de Ki67; o si predice de forma independiente el periodo libre de progresión o la sobrevida global.

De tal modo que conforme se obtenga cada vez más información en este respecto, una caracterización molecular inicial de la muestra histopatológica obtenida en una primera cirugía, en conjunto con aquellas variables que demuestren asociación con la expresión de marcadores de células stem (SOX1, SOX2, SOX9), podrán predecir cuáles subgrupos de pacientes se beneficiarán del tratamiento adyuvante; o incluso si existe correlación entre la expresión de estos marcadores y un mayor periodo libre de progresión, lo cual impactará en una mejor adecuación e individualización del tratamiento a cada paciente.

## 6) METODOLOGÍA

Diseño de estudio:

- Estudio observacional, analítico y retrospectivo.

Población:

- Población blanco: Pacientes a nivel mundial con diagnóstico histopatológico de neoplasia glial de cualquier grado histopatológico de la OMS, mayores de 18 años, con recurrencia tumoral reintervenida quirúrgicamente y documentada por histopatología.
- Población elegible: Pacientes mexicanos con diagnóstico histopatológico de neoplasia glial de cualquier grado histopatológico de la OMS, mayores de 18 años, con recurrencia tumoral reintervenida quirúrgicamente y documentada por histopatología.
- Población participante: Pacientes mexicanos con diagnóstico histopatológico de neoplasia glial de cualquier grado histopatológico de la OMS realizado durante el año 2014, mayores de 18 años, con recurrencia tumoral reintervenida quirúrgicamente y documentada por histopatología en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Dr. Manuel Velasco Suárez”.

Muestra:

- Se realizó un primer análisis del registro de biopsias del departamento de Neuropatología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Dr. Manuel Velasco Suárez” mediante un muestreo no probabilístico consecutivo del 1 de enero al 31 de diciembre de 2014. Se seleccionó dicho periodo debido a que esto incrementaba las posibilidades de contar con bloques de parafina accesibles para análisis histopatológico, con estudios de imagen disponibles en

la red del hospital y por la posibilidad de completar un seguimiento suficiente considerando la sobrevida global reportada en la literatura<sup>1</sup>. Se identificaron los reportes histopatológicos con diagnóstico de glioma de cualquier grado histopatológico y se consignaron los números de expedientes de los pacientes y los números de biopsia. En total se identificaron 138 pacientes con diagnóstico histopatológico de tumor glial.

- La revisión de expedientes clínicos y radiológicos se planeó en dos etapas. Primero, un estudio piloto confirmatorio de las hipótesis establecidas en este proyecto a realizarse en la primera mitad de los pacientes, contenido de esta tesis y posteriormente, una segunda etapa para incrementar el tamaño de la muestra con los pacientes restantes.
- En la primera etapa se analizaron un total de 69 expedientes clínicos y radiológicos para seleccionar a aquellos que cumplieran los criterios de inclusión del estudio. De dicha muestra, 21 pacientes fueron reintervenidos quirúrgicamente por recurrencia tumoral y contaron con expedientes clínicos completos para su revisión, estudios de imagen disponibles en versión impresa o a través de la red del hospital y con bloques de parafina para su análisis. Esto representa 30.43% del total, lo cual está en acuerdo con lo reportado por Weller, donde establece que únicamente 20-30% de los pacientes con recurrencia tumoral son candidatos a reintervención quirúrgica<sup>35</sup> (Ver **Figura 2**).

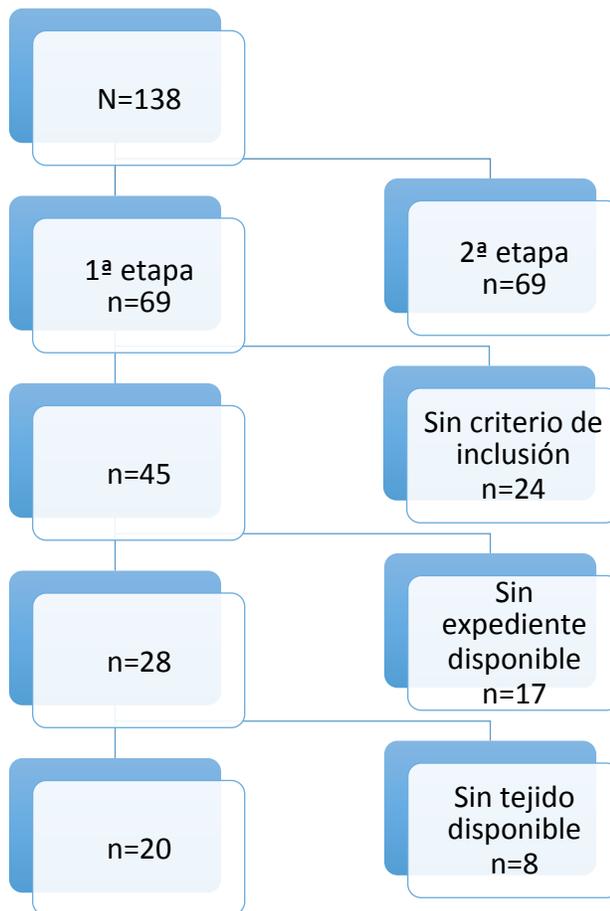
Criterios de selección de estudio:

*Criterios de inclusión:*

- Ser Mexicano
- Contar con una edad mayor a 18 años
- Haber sido sometido a una reintervención quirúrgica en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Dr. Manuel Velasco Suárez” con el diagnóstico de

recurrencia tumoral confirmada por histopatología en el Departamento de Neuropatología.

- Contar con el diagnóstico histopatológico primario de neoplasia glial sin importar el grado histopatológico de la OMS, a partir del tejido proveniente de la muestra obtenida en la primera intervención quirúrgica en cualquier hospital.



**Figura 2.** Algoritmo descriptivo de la población elegible y la muestra final analizada.

*Criterios de exclusión:*

- No contar con muestra de tejido de la primera cirugía o de la reintervención quirúrgica en bloques de parafina para su análisis.

- No contar con suficiente información en expediente clínico.
- No contar con estudios de imagen asequibles para su análisis.

*Criterios de eliminación:*

- Muestras de tejido en bloques de parafina no útiles para su estudio histopatológico.

Procedimientos:

*Atención médica, diagnóstico de sospecha, diagnóstico confirmatorio y tratamiento quirúrgico*

- El diagnóstico de sospecha y la confirmación diagnóstica se desarrolló de la siguiente manera:
- En el caso de que el paciente acudiera por primera vez al área de urgencias, el diagnóstico de sospecha fue realizado en conjunto por neurólogos y neurocirujanos con la ayuda de un estudio de tomografía axial computarizada con contraste (TAC+cte). De acuerdo a la severidad del cuadro clínico y la urgencia quirúrgica, se decidió la referencia a la consulta externa de nuestra institución con tratamiento médico con corticosteroide oral (prednisona 40 mg/día) y profilaxis anticomisial en caso necesario a criterio del médico tratante, y se solicitó una resonancia magnética con contraste (IRM+gd) electiva en pacientes sin hipertensión intracraneal, o bien, en caso de pacientes con un estado de salud más delicado, se ingresó al paciente a piso de hospitalización para manejo de edema cerebral con corticosteroide intravenoso (dexametasona 8 mg cada 8 horas) y se completó el estudio de imagen correspondiente para confirmar el diagnóstico. En aquellos pacientes con deterioro neurológico agudo e hipertensión intracraneal, la cirugía se ofreció inmediatamente aún sin contar con IRM+gd. En el caso de los

pacientes enviados a consulta externa, el diagnóstico de sospecha se confirmó en conjunto entre el neurocirujano y la interpretación del estudio de IRM+gd por parte de un neurorradiólogo.

- Aquellos pacientes con confirmación diagnóstica por IRM+gd, a excepción de aquellos intervenidos urgentemente por el residente de mayor jerarquía durante la guardia, se programaron para cirugía electiva o semi-electiva a cargo de neurocirujanos oncólogos con amplia experiencia en el tratamiento de esta patología. Por ende, la fecha en la que se realizó el diagnóstico se consideró como la fecha de realización de la IRM+gd o la TAC+cte en las excepciones antes mencionadas.
- Toda vez que fuera posible, se intentó lograr una resección máxima segura, no obstante, en función del KPS, comorbilidades, localización, lateralidad y tamaño tumoral, la relación del tumor con áreas elocuentes y los síntomas clínicos, a criterio del neurocirujano pudo elegirse una resección subtotal, parcial o biopsia. Cada caso fue individualizado y en caso de considerarse necesario, se hizo uso de recursos transoperatorios como la craneotomía con paciente despierto, o el protocolo dormido-despierto-dormido para mapeo motor o del lenguaje con o sin estimulador de Ojemann, neuronavegación, aspirador ultrasónico, etc.
- Se intentó realizar una IRM+gd dentro de las primeras 72 horas del postoperatorio, sin embargo esto no siempre fue posible. Los pacientes fueron egresados por mejoría en cuanto su condición lo permitiera y fueron enviados a consulta externa para seguimiento postquirúrgico.

#### *Diagnóstico histopatológico*

- Las biopsias obtenidas de la primera cirugía y la reintervención fueron procesadas por el método usual para microscopia de luz. Los fragmentos de

tejido fueron fijados en paraformaldehído al 4% en amortiguador de fosfato salino 0.1 M pH 7.4 y se colocaron en cápsulas de plástico (Electron Microscopy Sciences, Washington USA) y fueron deshidratados en alcoholes graduales y posteriormente embebidos en parafina en un procesador automático de tejidos (Histokinette 200, Reichert-Jung, American Optical Buffalo, NY). Los tejidos fueron incluidos en parafina y se realizaron cortes de 4  $\mu$ m con un microtomo (Rotary microtome HM 325, Microm International GMBH Walldorf, Germany), los cuales fueron montados en portaobjetos previamente tratados con silano (3-aminopropyltriethoxy-silane) al 2% en acetona, para que fueran adheridos al portaobjetos y evitar así que se despegaran en el procesamiento posterior.

- Se analizaron las laminillas teñidas con la tinción de hematoxilina y eosina y se estudió el aspecto histopatológico mediante el análisis de dos neuropatólogos expertos, y en caso de duda, se hizo una valoración ciega por un segundo neuropatólogo y se consensó el diagnóstico en el expediente clínico. Se siguió la clasificación histológica de la OMS de 2007 para asignar un grado histopatológico (I-IV)<sup>2</sup>.

#### *Reintervención quirúrgica*

- Durante el seguimiento clínico-radiológico del paciente de acuerdo al algoritmo de la NCCN<sup>22</sup>, se detectaron a aquellos pacientes con progresión tumoral de acuerdo a los criterios RANO<sup>20</sup>. Se contempló la edad, KPS del paciente, localización, tamaño tumoral, presencia o ausencia de lesiones a distancia o bilaterales, síntomas clínicos, comorbilidades, grado histopatológico, historia de tratamiento adyuvante, preferencias personales del paciente y mediante un panel multidisciplinario de expertos se indicó la reintervención quirúrgica

urgente o electiva a cargo de neurocirujanos oncólogos con amplia experiencia.

- La muestra tumoral obtenida de la cirugía se analizó de manera convencional (ver arriba).
- Se intentó realizar una IRM+gd dentro de las primeras 72 horas del postoperatorio, sin embargo esto no siempre fue posible. Los pacientes fueron egresados por mejoría en cuanto su condición lo permitiera y fueron enviados a consulta externa para seguimiento postquirúrgico.

#### *Tratamiento médico complementario*

- Una vez realizada la primera cirugía o la reintervención, el paciente fue enviado a consulta del radioneurocirujano, neuro-oncólogo y neurocirujano oncólogo para su seguimiento. Dichos especialistas, de acuerdo a la condición clínica del paciente, diagnóstico histopatológico y preferencia del paciente, indicaron el tratamiento adyuvante de primera vez y/o de rescate con quimio/radioterapia de acuerdo a las guías de la NCCN<sup>22</sup>. Es importante mencionar que nuestra institución no cuenta con la disponibilidad para el análisis molecular de la codeleción 1p/19q, estado de metilación de *MGMT* o identificación de la mutación IDH1/2 de manera rutinaria, salvo ciertas excepciones, por lo que el criterio entre los dos neuro-oncólogos de nuestra institución pudo no haber sido del todo homogéneo.

#### *Revisión de expediente clínico*

- Se analizaron expedientes en papel o electrónicos en busca de los datos demográficos y clínicos prequirúrgicos como edad, sexo, síntomas de presentación, KPS antes de la primera cirugía y de la reintervención.

- De igual forma se revisaron las notas de evolución del equipo multidisciplinario neuro-oncológico y se consignaron fechas de inicio y/o término de tratamiento adyuvante, fármacos empleados, dosis de radiación y fracciones, modalidad de radioterapia, tiempo para la realización de IRM+gd postoperatoria, tiempo entre la primera cirugía y quimio/radioterapia y tiempo entre la quimio/radioterapia y el diagnóstico de progresión, entre otros.
- Se consideró como seguimiento el tiempo entre el diagnóstico por imagen y la fecha de defunción, fecha de la última consulta disponible en el expediente electrónico o el 1 de febrero de 2018 de manera arbitraria. Se calculó el periodo libre de progresión y la sobrevida global desde la fecha de primera cirugía hasta la fecha donde se detectó progresión por imagen y hasta la defunción o la pérdida de seguimiento, respectivamente.

#### *Revisión de expediente radiológico*

- Se analizaron de forma pre y postquirúrgica en el expediente electrónico o en estudios impresos en papel, fechas de realización, localización tumoral, lesiones únicas o múltiples, uni o bilaterales, contacto ventricular, extensión de la resección basado en el volumen tumoral preoperatorio y postoperatorio por volumetría mediante el software gratuito Horos (The Horos Project, Nimble Co LLC d/b/a Purview in Annapolis, MD USA) en secuencias T1 con contraste para lesiones de alto grado o T2/T2 FLAIR para lesiones de bajo grado, en caso de que los estudios estuvieran disponibles para su análisis. En caso contrario el volumen tumoral se calcularía en los estudios de imagen impresos con la fórmula para el volumen de un elipsoide,  $a*b*c/2$ . Para ambas volumetrías no se consideraron porciones quísticas, realces periféricos que no pudieran medirse bajo estas técnicas, o lesiones en otros sitios.

- De igual forma se valoraron las IRM+gd durante todo el seguimiento de los pacientes después de la primera cirugía, en busca de progresión de acuerdo a los criterios RANO<sup>20</sup>, especificando como fecha de progresión a aquella fecha de la resonancia donde se documentara dicho hallazgo.

*Revisión de bloques de parafina para inmunohistoquímica*

- De manera retrospectiva, se buscaron los bloques de parafina obtenidos de la primera cirugía y la reintervención de cada uno de los pacientes incluidos en la muestra a través del número de biopsia registrado y se realizaron cortes de 4  $\mu$ m con un microtomo (Rotary microtome HM 325, Microm International GMBH Walldorf, Germany), los cuales fueron montados en portaobjetos previamente tratados con silano (3-aminopropyltriethoxy-silane) al 2% en acetona, para que fueran adheridos al portaobjetos y evitar así que se despegaran en el procesamiento posterior.
- Los cortes fueron desparafinados en xilol e hidratados en secuencias decrecientes de soluciones de alcohol desde absoluto, 96%, 80%, 70% y agua destilada. Posteriormente fueron colocadas en PBS por 3 min, con peroxidasa endógena y peróxido de hidrógeno al 0.3% en agua destilada por 15 min. Las laminillas se enjuagaron en PBS por 3 min, se bloquearon sitios inespecíficos con albúmina sérica bovina libre de IgG1 (Sigma, St. Louis MO, USA) al 0.2% en PBS por 20 min.
- Para la técnica por inmunofluorescencia, después de lavar cada una de las laminillas, se añadió una gota del anticuerpo anti-SOX1 goat + anti-Ki67 mouse (análisis 1), anti-SOX2 mouse + anti-Ki67 goat (análisis 2), anti-SOX9 mouse + anti-Ki67 goat (análisis 3) y anti-IDH1 mouse (análisis 3) (SOX e IDH1: Sigma; Ki67: Santa Cruz, SC7849) en una dilución 1:50 y se incubaron durante 2 horas. Posteriormente, se lavaron las laminillas y se incubaron durante 1 hora

con anticuerpo secundario conjugado con fluoresceína: para anti-SOX2, anti-SOX9 y anti-IDH1 se conjugaron con FITC (Jackson Immuno, 115-095-166); para anti-SOX1 con Alexa Fluor 488 (Invitrogen, 51475A); y para anti-Ki67 con Rodamina goat (Jackson Immuno, 115-025-166). Por último, se colocaron en un medio de montaje para la fluorescencia con DAPI (Sigma, 28718-90-3). Las láminas fueron analizadas con un programa de imagen adaptada a un microscopio Olympus (1X81F3) y la inmunopositividad se cuantificó mediante el análisis de densidad óptica con el software Image-Pro Plus versión 7.0.

Variables:

VARIABLE				
EDAD AL MOMENTO DEL DIAGNÓSTICO	CUANTITATIVA	CONTINUA	RAZÓN	COVARIABLE
SEXO	CUALITATIVA	NOMINAL	DICOTÓMICA	COVARIABLE
LATERALIDAD MANUAL	CUALITATIVA	NOMINAL	CATEGÓRICA	COVARIABLE
KARNOFSKY ANTES Y DESPUÉS DE LA PRIMERA CIRUGÍA	CUALITATIVA	ORDINAL		COVARIABLE
KARNOFSKY ANTES Y DESPUÉS DE LA REINTERVENCIÓN QUIRÚRGICA	CUALITATIVA	ORDINAL		COVARIABLE
KARNOFSKY AL TÉRMINO DEL SEGUIMIENTO	CUALITATIVA	ORDINAL		COVARIABLE
SIGNO/SÍNTOMA CLÍNICO DE PRESENTACIÓN ANTES DE LA PRIMERA CIRUGÍA Y LA REINTERVENCIÓN QUIRÚRGICA	CUALITATIVA	NOMINAL	CATEGÓRICA	COVARIABLE
VOLUMEN TUMORAL ANTES Y DESPUÉS DE LA PRIMERA CIRUGÍA	CUANTITATIVA	CONTINUA	DE RAZON	COVARIABLE
VOLUMEN TUMORAL ANTES Y DESPUÉS DE LA REINTERVENCIÓN QUIRÚRGICA	CUANTITATIVA	CONTINUA	DE RAZON	COVARIABLE
LOCALIZACIÓN TUMORAL ANTES DE LA PRIMERA CIRUGÍA Y LA REINTERVENCIÓN QUIRÚRGICA	CUALITATIVA	NOMINAL	CATEGÓRICA	COVARIABLE
LATERALIDAD DE LA LESIÓN ANTES DE LA PRIMERA CIRUGÍA Y LA REINTERVENCIÓN QUIRÚRGICA	CUALITATIVA	NOMINAL	CATEGÓRICA	COVARIABLE

LESIONES MÚLTIPLES ANTES DE LA PRIMERA CIRUGÍA Y LA REINTERVENCIÓN QUIRÚRGICA	CUALITATIVA	NOMINAL	DICOTÓMICA	COVARIABLE
LESIONES BILATERALES	CUALITATIVA	NOMINAL	DICOTÓMICA	COVARIABLE
CONTACTO CON EL VENTRÍCULO ANTES DE LA PRIMERA CIRUGÍA	CUALITATIVA	NOMINAL	DICOTÓMICA	COVARIABLE
TIEMPO ENTRE PRIMERA CIRUGÍA Y RESONANCIA MAGNÉTICA DE CONTROL	CUANTITATIVA	CONTINUA	DE RAZON	COVARIABLE
TIEMPO ENTRE LA REINTERVENCIÓN QUIRÚRGICA Y RESONANCIA MAGNÉTICA DE CONTROL	CUANTITATIVA	CONTINUA	DE RAZON	COVARIABLE
EOR DESPUÉS DE LA PRIMERA CIRUGÍA Y LA REINTERVENCIÓN QUIRÚRGICA	CUALITATIVA	ORDINAL		COVARIABLE
PERIODO LIBRE DE PROGRESIÓN RADIOLÓGICA EN MESES	CUANTITATIVA	CONTINUA	DE RAZON	DEPENDIENTE
PERIODO LIBRE DE PROGRESIÓN CLÍNICA	CUANTITATIVA	DISCRETA	INTERVALO	DEPENDIENTE
QUIMIOTERAPIA ENTRE LA PRIMERA CIRUGÍA Y LA REINTERVENCIÓN QUIRÚRGICA	CUALITATIVA	NOMINAL	DICOTÓMICA	COVARIABLE
RADIOTERAPIA ENTRE LA PRIMERA CIRUGÍA Y LA REINTERVENCIÓN QUIRÚRGICA	CUALITATIVA	NOMINAL	DICOTÓMICA	COVARIABLE
TIEMPO ENTRE LA PRIMERA CIRUGÍA Y QUIMIOTERAPIA EN MESES	CUANTITATIVA	CONTINUA	DE RAZÓN	COVARIABLE
TIEMPO ENTRE LA PRIMERA CIRUGÍA Y RADIOTERAPIA EN MESES	CUANTITATIVA	CONTINUA	DE RAZÓN	COVARIABLE
TIEMPO ENTRE LA QUIMIOTERAPIA Y EL DIAGNÓSTICO DE PROGRESIÓN EN MESES EN QUIENES LA RECIBIERON ENTRE LA PRIMERA CIRUGÍA Y LA REINTERVENCIÓN QUIRÚRGICA	CUANTITATIVA	CONTINUA	DE RAZÓN	COVARIABLE
TIEMPO ENTRE LA RADIOTERAPIA Y EL DIAGNÓSTICO DE PROGRESIÓN EN MESES EN QUIENES LA RECIBIERON ENTRE LA PRIMERA CIRUGÍA Y LA REINTERVENCIÓN QUIRÚRGICA	CUANTITATIVA	CONTINUA	DE RAZÓN	COVARIABLE
GRADO HISTOPATOLÓGICO DE LA MUESTRA DE LA PRIMERA	CUALITATIVA	ORDINAL		INDEPENDIENTE

CIRUGÍA Y LA REINTERVENCIÓN QUIRÚRGICA				
% DE TRANSFORMACIÓN DE BAJO GRADO (I-II) A ALTO GRADO (III-IV) ENTRE LA PRIMERA CIRUGÍA Y LA REINTERVENCIÓN QUIRÚRGICA	CUANTITATIVA	CONTINUA	DE RAZÓN	DEPENDIENTE
% DE PERMANENCIA DE PRIMERA MUESTRA EN BAJO GRADO (I-II) ENTRE LA PRIMERA CIRUGÍA Y LA REINTERVENCIÓN QUIRÚRGICA	CUANTITATIVA	CONTINUA	DE RAZÓN	DEPENDIENTE
% DE PERMANENCIA DE PRIMERA MUESTRA EN ALTO GRADO (III-IV) ENTRE LA PRIMERA CIRUGÍA Y LA REINTERVENCIÓN QUIRÚRGICA	CUANTITATIVA	CONTINUA	DE RAZÓN	DEPENDIENTE
EXPRESIÓN DE SOX1, SOX2, SOX9 Y NESTINA EN LA MUESTRA HISTOPATOLÓGICA OBTENIDA DE LA PRIMERA CIRUGÍA Y LA REINTERVENCIÓN QUIRÚRGICA	CUANTITATIVA CUALITATIVA	CONTINUA ORDINAL	DE RAZÓN	INDEPENDIENTE
EXPRESIÓN DE KI67 E IDH 1 EN LA MUESTRA HISTOPATOLÓGICA OBTENIDA DE LA PRIMERA CIRUGÍA Y LA REINTERVENCIÓN QUIRÚRGICA	CUANTITATIVA CUALITATIVA	CONTINUA ORDINAL	DE RAZÓN	INDEPENDIENTE
SOBREVIDA GLOBAL EN MESES	CUANTITATIVA	CONTINUA	DE RAZÓN	DEPENDIENTE
SEGUIMIENTO EN AÑOS	CUANTITATIVA	CONTINUA	DE RAZÓN	DEPENDIENTE

#### Análisis estadístico:

- No se realizó cálculo estadístico de la muestra.
- Se utilizaron medidas de dispersión y de tendencia central, así como gráficas de barras y de dispersión como medidas descriptivas para caracterizar las variables del estudio.
- Se analizó la distribución de las variables mediante la inspección de gráficos, el cálculo estadístico del sesgo y curtosis, así como la prueba de Shapiro-Wilk en casos determinados, y se consideró una distribución normal con una  $p > 0.05$ .

- Se analizaron diferencias entre variables categóricas nominales u ordinales con Chi-cuadrada o Prueba exacta de Fisher de acuerdo al número de mediciones en cada casilla de tablas de contingencia R x C. Para las diferencias entre variables independientes categóricas y variables dependientes continuas se utilizó ANOVA de una o dos vías con prueba post-hoc de Bonferroni si tenían distribución normal, o bien la prueba de Kruskal-Wallis o Fridman para una distribución no normal.
- En el caso de comparación de medias entre dos grupos, de acuerdo a su distribución, se utilizó la prueba T-Student no pareada para grupos independientes o pareada para grupos dependientes o la prueba de suma de rangos o rangos signados de Wilcoxon para una distribución normal y no normal, respectivamente.
- Se realizó un análisis de correlación con la prueba de Pearson o Spearman de acuerdo a si tuvieron distribución normal o no normal, respectivamente. Se expresó el coeficiente de correlación y su significancia estadística.
- Se reportaron curvas de Kaplan Meier para la OS y el PFS y se realizó una prueba Log Rank para determinar diferencias entre los grupos.
- Se consideró una significancia estadística con una valor de  $p < 0.05$ .

## 7) **CONSIDERACIONES ÉTICAS**

A todos los pacientes se les solicitó autorización para las intervenciones médicas, diagnósticas y quirúrgicas, previa explicación de riesgos y beneficios durante el momento de su atención hospitalaria y su seguimiento a través de una carta de consentimiento informado almacenada en expediente clínico.

Al ser un estudio retrospectivo, no fue necesario solicitar autorización de parte de los pacientes para el uso del tejido almacenado en el departamento de Neuropatología de nuestra institución.

El protocolo de investigación fue entregado y evaluado por la Dirección de Investigación Clínica.

## **8) CONSIDERACIONES FINANCIERAS**

El estudio fue llevado a cabo en la Subdirección de Neurocirugía en colaboración con el Departamento de Neurorradiología, de Neuropatología y el Laboratorio de Neurofisiología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Dr. Manuel Velasco Suárez”, cada uno con presupuestos anuales definidos para labores de investigación.

## 9) RESULTADOS

### *Variables perioperatorias demográficas, clínicas, radiológicas e histopatológicas de la primera cirugía y la reintervención*

En la **Tabla 3** se aprecian las características clínicas y demográficas de la población del estudio (n=20). La media de edad al momento del diagnóstico fue de 36.7 años (16-62 años) con un 50% de hombres y 50% de mujeres. El KPS antes de la primera cirugía fue de 90 (IQR [rango intercuartil] 72.5-90), mientras que para la reintervención fue de 85 (IQR, 70-90). La presentación clínica más frecuente antes de la primera cirugía fue la hipertensión intracraneal, seguida por déficit sensitivo-motor y crisis convulsivas, mientras para la reintervención dichas presentaciones clínicas se manifestaron en igual porcentaje.

Treinta por ciento de los pacientes recibieron quimioterapia adyuvante después de la primera cirugía y 35% la recibieron después de la reintervención, en un transcurso de 91.5 (IQR 80-281) y 79 (IQR 56-224) días, respectivamente. Sesenta por ciento de los pacientes recibieron radioterapia adyuvante después de la primera cirugía mientras que 25% la recibieron después de la reintervención, en el transcurso de 62 (IQR 35.5-203) y 54 (IQR 37-169) días respectivamente.

Posterior a la primera cirugía 5 pacientes con tumor grado II, 4 con grado III y 3 con grado IV recibieron radioterapia mientras que 1 paciente con glioma grado II, 3 con grado III y 2 con grado IV recibieron quimioterapia. Posterior a la reintervención 2 paciente con grado II, 2 paciente con grado III y 1 pacientes con grado IV recibieron radioterapia mientras que 3 pacientes con grado II, 3 pacientes con grado III y 1 paciente con grado IV recibieron quimioterapia (Ver **Figura 3**).

**Tabla 3. Características demográficas y clínicas perioperatorias de la primera cirugía y de la reintervención.**

	Primera cirugía	Reintervención
N		20
Edad media al diagnóstico, años $\pm$ D.E.		36.7 $\pm$ 12.4
Rango		16-62
Sexo masculino, número (%)		10 (50)
KPS, mediana (IQR)	90 (72.5-90)	85 (70-90)
Presentación clínica prequirúrgica, número (%)		
Asintomático/incidental	1 (5) <sup>a</sup>	5 (25) <sup>b</sup>
Crisis convulsivas	7 (35)	9 (45)
Déficit sensitivo-motor	9 (45)	9 (45)
Alteración cerebelosa	1 (5) <sup>c</sup>	1 (5)
Alteración del lenguaje	6 (30)	2 (10)
Hipertensión intracraneal	12 (60)	9 (45)
Quimioterapia adyuvante		
Si, número (%)	6 (30) <sup>d</sup>	7 (35) <sup>e</sup>
Mediana de tiempo de inicio de quimioterapia en días (IQR)	91.5 (80-281)	79 (56-224)
Radioterapia adyuvante		
Si, número (%)	12 (60) <sup>f</sup>	5 (25) <sup>g</sup>
Mediana de tiempo de inicio de radioterapia en días (IQR)	62 (35.5-203)	54 (37-169)

<sup>a</sup> Incidentaloma en un estudio de imagen indicado por otra causa.

<sup>b</sup> Se diagnosticó progresión por estudio de imagen durante el seguimiento sin presentar otro síntoma o signo clínico.

<sup>c</sup> Secundario a compresión vermiana por un astrocitoma policítico de fosa posterior.

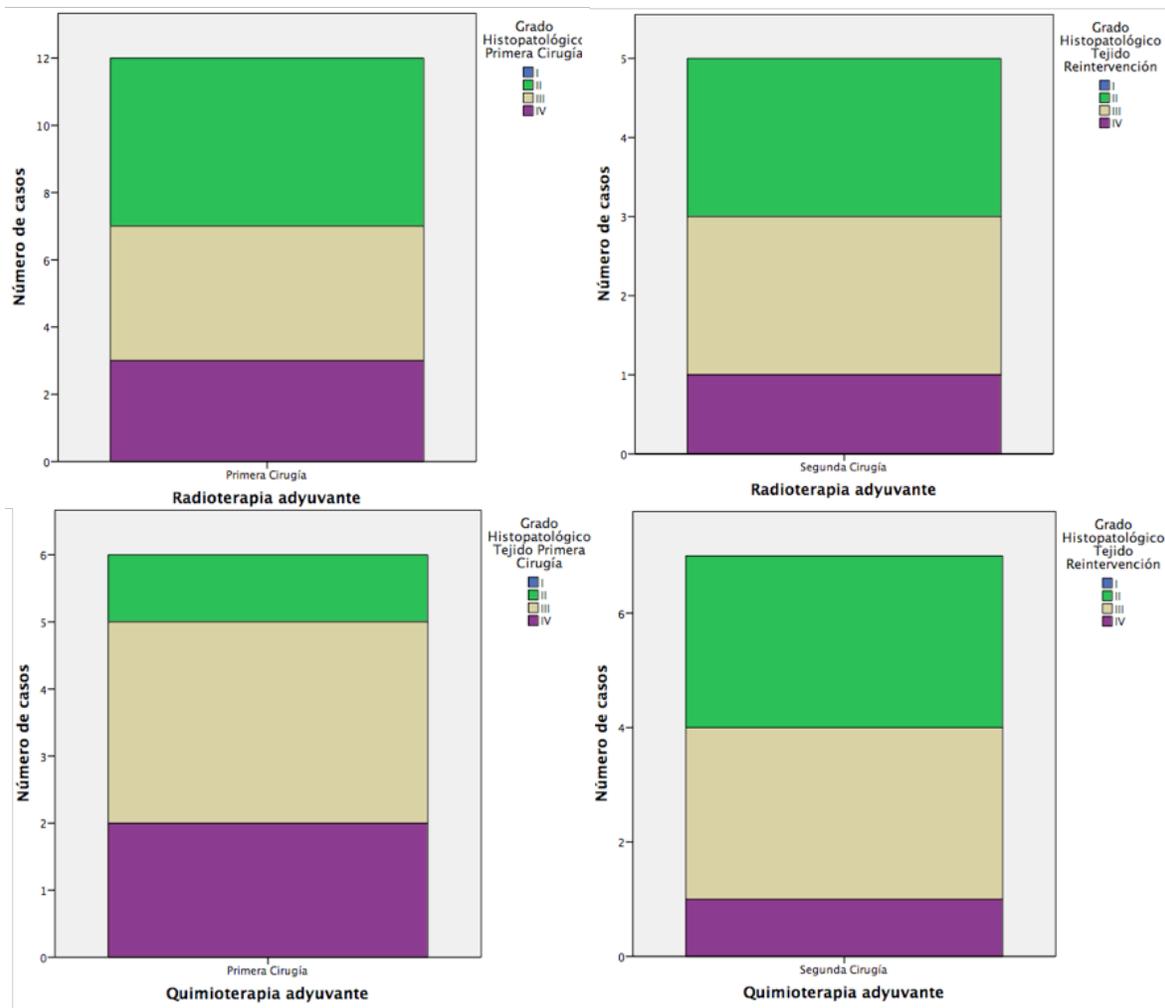
<sup>d</sup> En los seis casos se administró en conjunto con radioterapia.

<sup>e</sup> En seis casos se administró de forma aislada.

<sup>f</sup> En cuatro casos se administró en conjunto con radioterapia.

<sup>g</sup> En un caso se administró de forma aislada. Ningún paciente recibió re-irradiación.

En cuanto a los hallazgos radiológicos (Ver **Tabla 4**), la localización tumoral más frecuente ocurrió en el lóbulo frontal, para la primera cirugía y la reintervención. Cincuenta y cinco por ciento de los gliomas se presentaron en el lado izquierdo, 40% en el derecho y un caso se presentó como una lesión cerebelosa en línea media. Para el momento de la reintervención en tres casos (15%) se observaron lesiones múltiples ipsi y/o contralaterales (Ver **Figura 4**).



**Figura 3.** Radioterapia y quimioterapia adyuvante posterior a la primer cirugía y reintervención de acuerdo al grado histopatológico.

El volumen preoperatorio antes de la primera cirugía fue de 52 cc (27.7-81.09), mientras que antes de la reintervención fue de 50 cc (12.6-134.9). El volumen tumoral postoperatorio tras la primera cirugía fue de 10.5 cc (1.2-45.5) mientras que después de la reintervención fue de 6.31 (4.2-44.1). En 30% de los pacientes se logró una resección mayor al 90% tras la primera cirugía y en 50% se logró tras la reintervención.

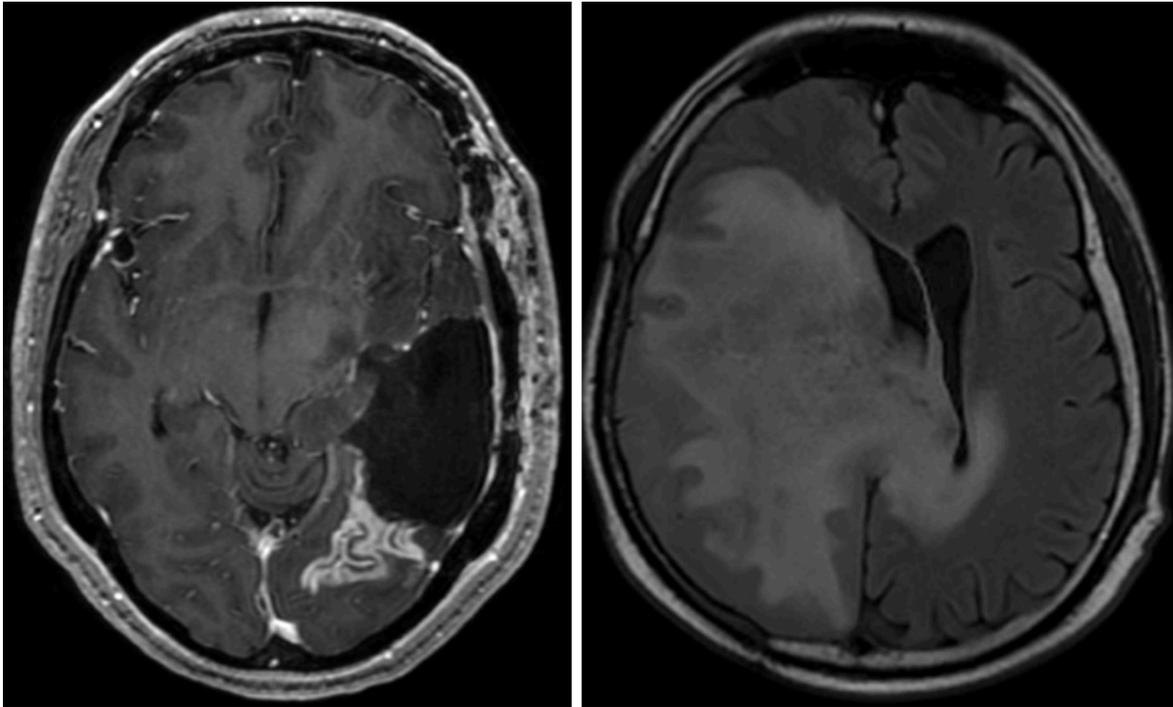
**Tabla 4. Características radiológicas perioperatorias de la primera cirugía y de la reintervención.**

	Primera cirugía	Reintervención
N	20	20
Localización tumoral, número (%)		
Frontal	11 (55)	11 (55)
Temporal	3 (15)	5 (25)
Parietal	1 (5)	1 (5)
Occipital	1 (5)	1 (5)
Insular	3 (15)	1 (5)
Vermiana	1 (5)	1 (5)
Contacto ventricular presente, número (%)	14 (70)	14 (70)
Lateralidad tumoral, número (%)		
Lesión múltiple	0 (0)	3 (15) <sup>a</sup>
Derecho	8 (40)	9 (45)
Izquierdo	11 (55)	11 (55)
Línea media	1 (5)	1 (5)
Volumen tumoral preoperatorio, cc (IQR)	52 (27.7-81.09)	50 (12.6-134.9)
Volumen tumoral postoperatorio, cc (IQR)	10.5 (1.2-45.6)	6.31 (4.2-44.1)
Extensión de la resección, número (%)		
GTR (100%)	4 (20)	5 (25)
STR (90<100%)	2 (10)	5 (25)
PR (<90%)	14 (70)	10 (50)

<sup>a</sup> Cuantificado por volumetría o con la fórmula para el volumen de una elipsoide  $AxBxC/2$  para la lesión intervenida.

<sup>b</sup> Esto contempló lesiones múltiples ipsilaterales o lesiones bilaterales. En el último caso, un paciente con lesión bilateral se asignó a ambas categorías "derecha" e "izquierda".

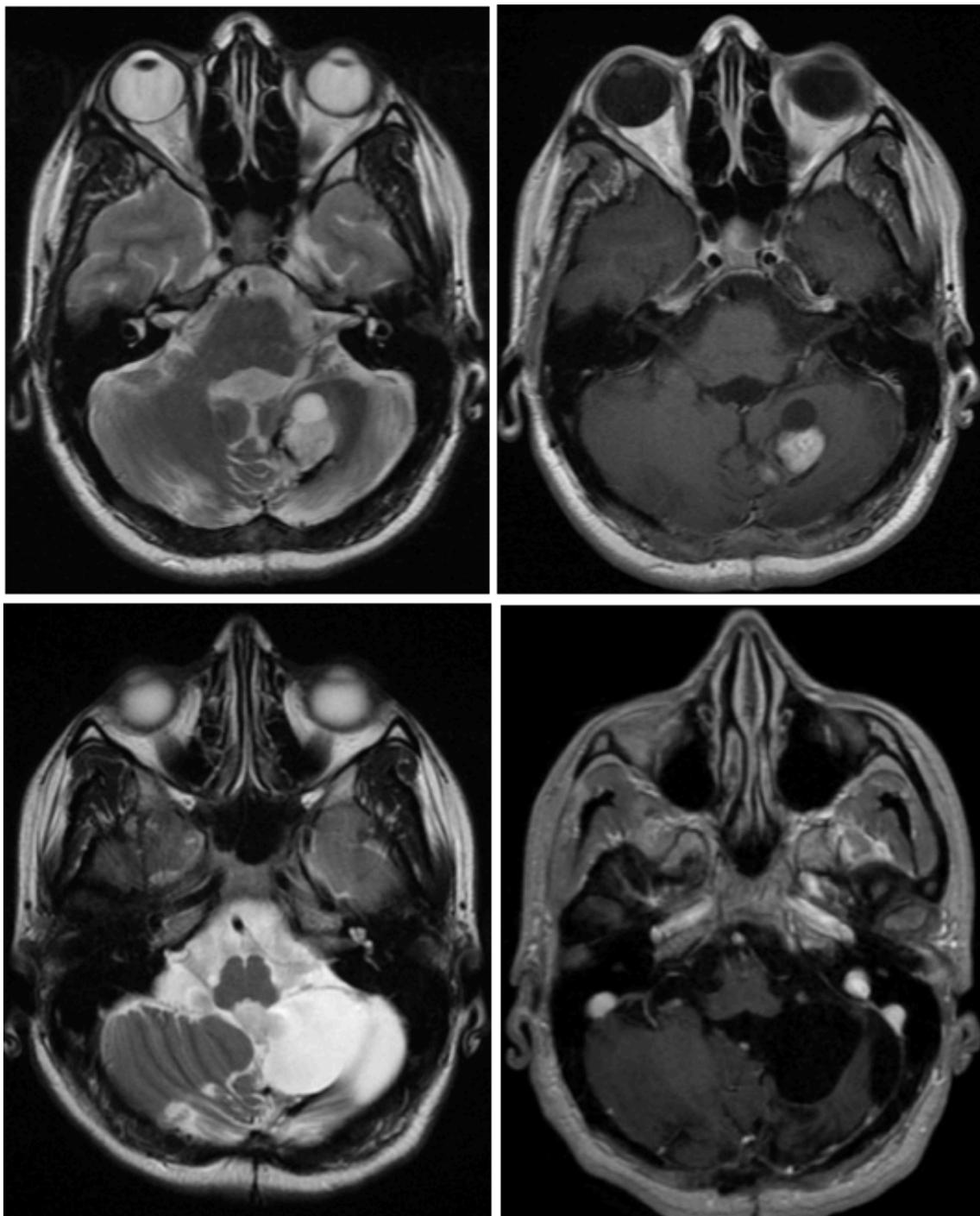
En la **Figura 5** se aprecia en un corte axial de una secuencia T1 con gadolinio antes y después de la cirugía un GTR. Se evidenció contacto ventricular directo en 70% de los casos caracterizado por la continuidad entre el tumor y la vasculatura endimaria de los ventrículos. En la **Figura 6** se desglosa el contacto ventricular de acuerdo al grado histopatológico. No se encontraron diferencias estadísticas entre grado histopatológico de la primera cirugía y el contacto ventricular mediante la prueba Exacta de Fisher ( $p=0.151$ ).



**Figura 4.** En el panel de lado izquierdo se aprecia el caso de un paciente que presentó progresión en los márgenes de la resección con infiltración hacia el tejido y hacia el espacio subaracnoideo ipsilateral en una secuencia T1 con gadolinio. En el panel de la derecha se aprecia una recidiva contralateral con infiltración del cuerpo calloso en una secuencia T2 FLAIR.

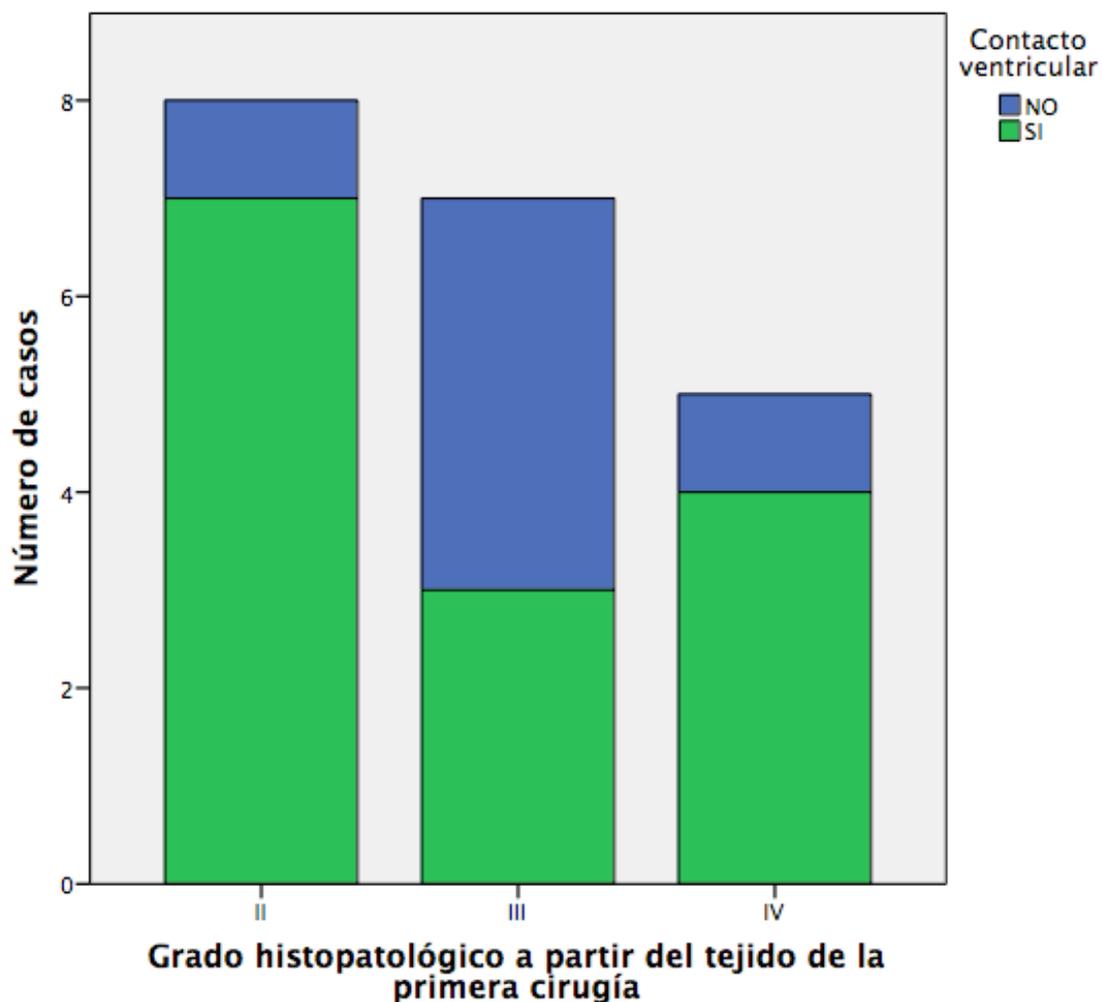
En la **Tabla 5** se observa que el reporte histopatológico de las muestras obtenidas después de la primera cirugía mostró 8 casos (40%) con grado II, 7 (35%) con grado III y 5 (25%) con grado IV. Para el reporte obtenido después de la reintervención 1 caso (5%) fue grado I, 2 grado II (10%), 8 (40%) grado III y 9 (45%) grado IV, lo cual hace evidente la progresión del grado tumoral con el transcurso del tiempo. De los 8 casos con reporte histopatológico de glioma grado II diagnosticados a partir del tejido obtenido de la primera cirugía, 2 (25%) permanecieron estables, 5 (62.5%) progresaron a un grado III y 1 (12.5%) progresó a un grado IV. De los 7 casos con reporte histopatológico de glioma grado III diagnosticados a partir del tejido obtenido de la primera cirugía, 3 (42.9%) no progresaron y 4 (57.1%) de ellos progresaron a un grado IV, no obstante no se encontraron diferencias estadísticas entre la capacidad de

transformación de acuerdo al grado histopatológico ( $p=0.608$ ) ni a la subcategorización en bajo y alto grado mediante la prueba Exacta de Fisher ( $p=0.608$ ) (Ver Figura 7).



**Figura 5.** Se aprecia en el panel superior una lesión paravermiana izquierda hiperintensa en T2 con un componente quístico que realza al contraste en la secuencia T1. En el panel inferior se muestra la resección GTR de la lesión

En relación al estudio de densidad óptica para las 12 biopsias analizadas (6 obtenidas a partir de la primer cirugía y 6 biopsias obtenidas a partir de la reintervención), la prueba de rangos signados de Wilcoxon o T-student para muestras relacionadas no mostró diferencias estadísticamente significativas para IDH, Ki67, SOX1, SOX2 y SOX9, lo cual habla de que la expresión inicial del marcador no se modifica con el transcurso del tiempo ni explica el porcentaje de transformación del grado histopatológico.

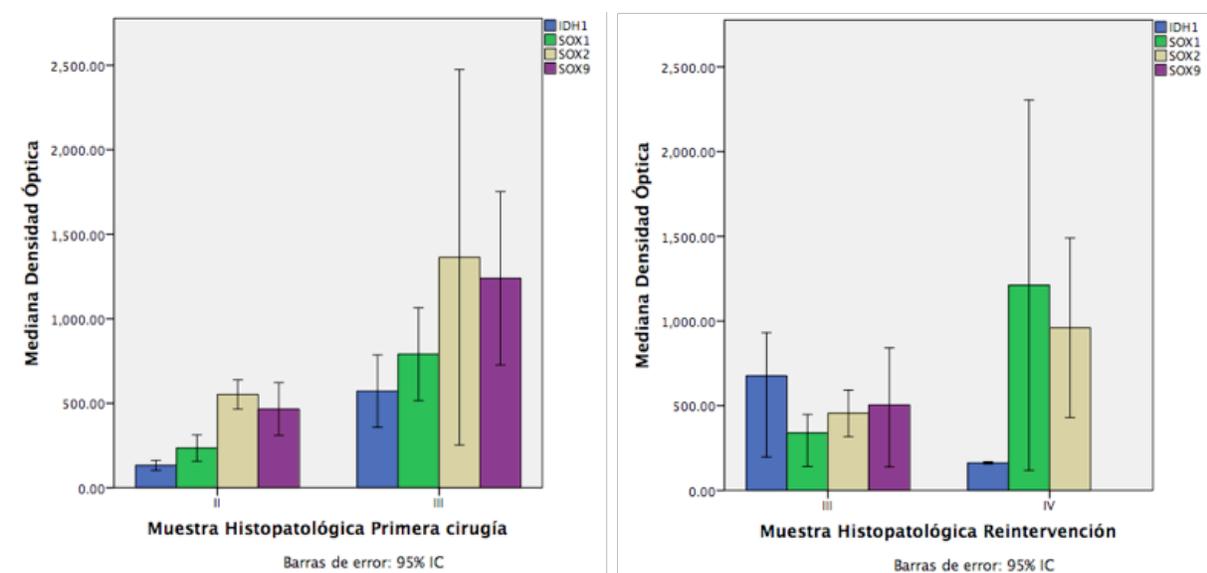


**Figura 6.** Distribución de acuerdo al grado histopatológico de la presencia o ausencia de contacto ventricular del tumor.



*Distribución de SOX1, SOX2, SOX9 de acuerdo al grado histopatológico de la OMS en el tejido de la primera cirugía y reintervención.*

En la **Figura 8** se detalla la distribución del análisis de densidad óptica obtenido de 12 muestras de tejido (6 muestras obtenidas a partir de la primera cirugía y 6 muestras obtenidas a partir de la reintervención). para los marcadores IDH1, SOX1, SOX2 y SOX9 respecto al grado histopatológico asignado. Si bien se aprecia un incremento



**Figura 8.** En esta figura se aprecia la distribución del análisis de densidad óptica para los marcadores IDH1, SOX1 SOX2 y SOX9 para el grado histológico obtenido a partir de la primera cirugía (Panel de la izquierda) y obtenido a partir de la reintervención (panel de la derecha).

evidente en dichos marcadores moleculares conforme el grado histopatológico aumenta, al comparar ambos paneles, observamos que las 6 muestras analizadas obtenidas a partir de la primera cirugía se clasificaron como grado II y III, mientras que en aquellas obtenidas a partir de la reintervención, se observó un mayor porcentaje de lesiones grado IV y ninguna lesión grado II. Esto permitió planarnos la idea de que la

detección de cifras elevadas de los marcadores moleculares mencionados podría predecir aquellas lesiones que más tarde mostrarían una transformación fenotípica a un grado histopatológico mayor y por ende un peor pronóstico, lo cual permitiría un tratamiento mejor dirigido y administrado con mayor anticipación, motivo por el cual realizamos la técnica de inmunofluorescencia (ver adelante).

En la **Tabla 6** se detallan estadísticos descriptivos y los resultados del análisis mediante la prueba ANOVA para medidas repetidas para SOX1, SOX2, SOX9, IDH y Ki67 en relación al grado histopatológico asignado en el tejido obtenido a partir de la primera cirugía.

**Tabla 6. Expresión de IDH1, SOX1, SOX2, SOX9 y Ki67 de acuerdo al grado histopatológico obtenido de la primera cirugía.**

	Grado II	Grado III	Grado IV	p
Inmunofluorescencia, densidad óptica primeracirugía (IQR) o ± D.E.				
IDH1	132.1 ± 41.5	455.1 ± 467.7	-	0.796 <sup>a</sup>
SOX1	566.4 ± 580	762.8 ± 427.5	-	0.811 <sup>a</sup>
SOX2	551.9 ± 122	1567.7 ± 1282.1	-	0.249 <sup>a</sup>
SOX9	1944.3 ± 2565	1239.3 ± 726.1	-	0.344 <sup>b</sup>
KI67	1066.8 ± 1588.8	973 ± 1017	-	0.508 <sup>b</sup>
Inmunofluorescencia reintervención, densidad óptica (IQR) ± D.E.				
IDH1	564.8 ± 519.2	162.9 ± 8.6	-	0.796 <sup>a</sup>
SOX1	310.1 ± 155.3	1211.6 ± 1546	-	0.811 <sup>a</sup>
SOX2	454.9 ± 194.4	960.4 ± 749.7	-	0.249 <sup>a</sup>
SOX9	495 ± 350.9	-	-	0.344 <sup>b</sup>
KI67	517.7 ± 243.1	953.8 ± 762.5	-	0.508 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>ANOVA de una vía para mediciones repetidas (Primera cirugía y reintervención),

<sup>b</sup>Prueba T de student para muestras independientes.

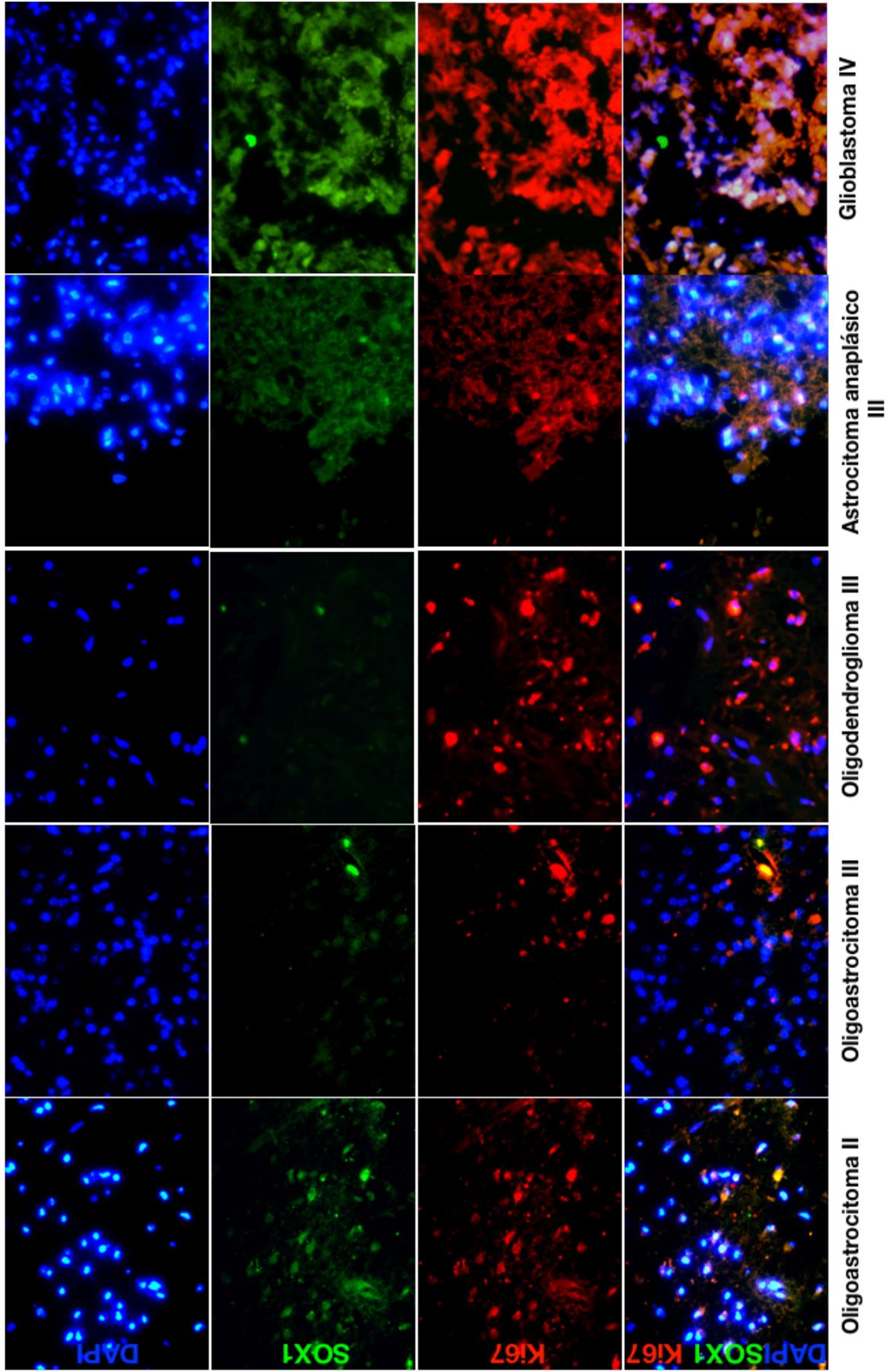
*Comarcaje entre SOX1, SOX2, SOX9 con Ki67 para diversos subtipos histopatológicos.*

Se observan en la **Figura 9** microfotografías obtenidas mediante la técnica de inmunofluorescencia a un aumento de 40X, donde se ejemplifica la relación entre el marcaje de SOX1, Ki67 y DAPI y el grado histopatológico de las muestras de tejidos obtenidas a partir de la primera cirugía y/o reintervención. Para el panel del oligoastrocitoma, se identifica una disparidad entre el grado histopatológico y la intensidad luminosa para dichos marcadores, dando la impresión de una mayor actividad proliferativa en lesión grado II en comparación con lesión grado III. No obstante, en los casos de astrocitoma anaplásico grado III y glioblastoma grado IV se aprecia una franca positividad para SOX1 y Ki67.

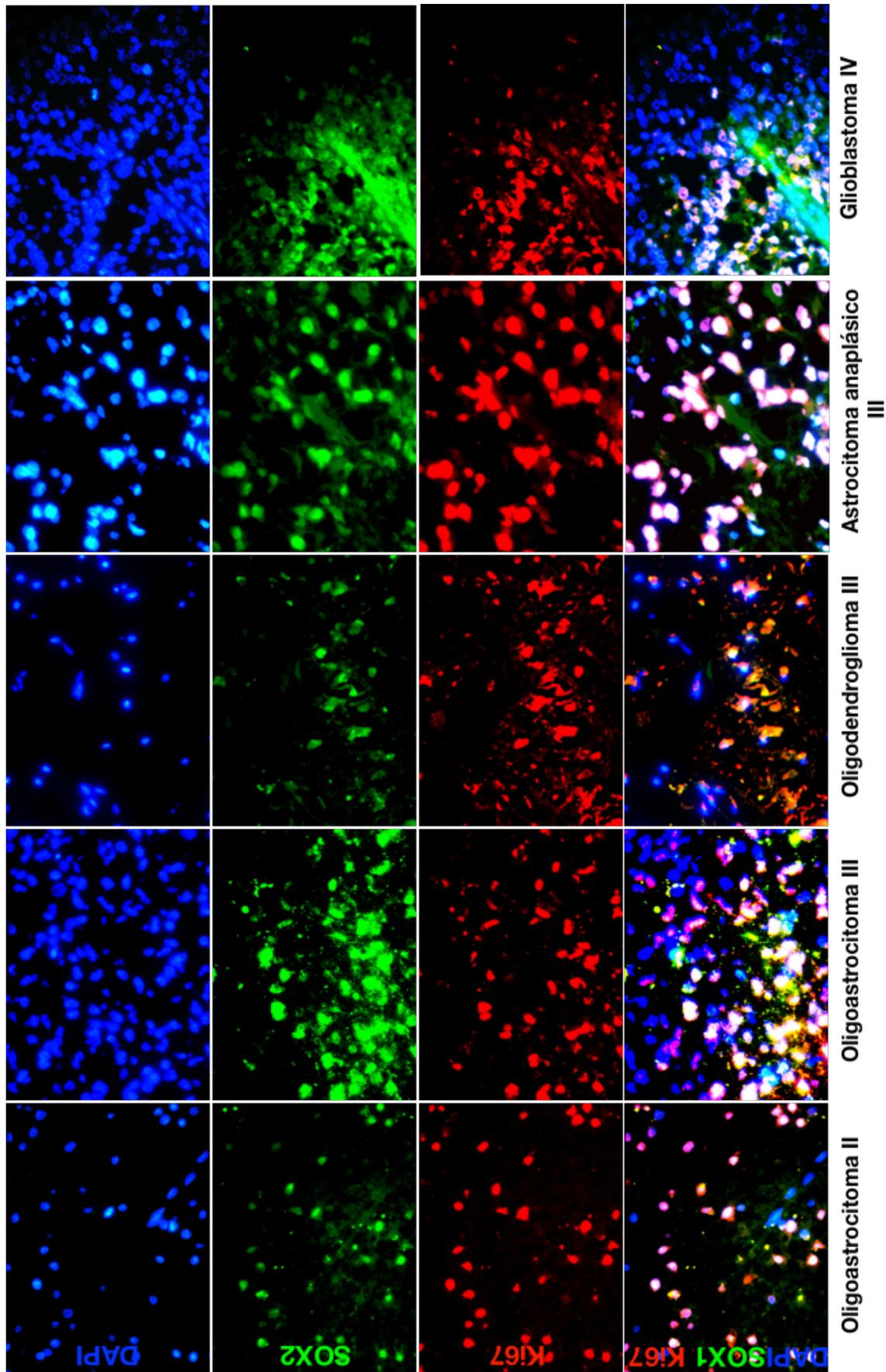
En la **Figura 10** se representa A SOX2 y Ki67. Se aprecia que la intensidad luminosa es mucho más marcada en comparación con SOX1. Se observa la relación entre mayor grado histopatológico y mayor inmunopositividad al marcador y llama la atención la similitud entre el caso del oligoastrocitoma grado III y el astrocitoma anaplásico, dos lesiones con un comportamiento clínico marcadamente distinto.

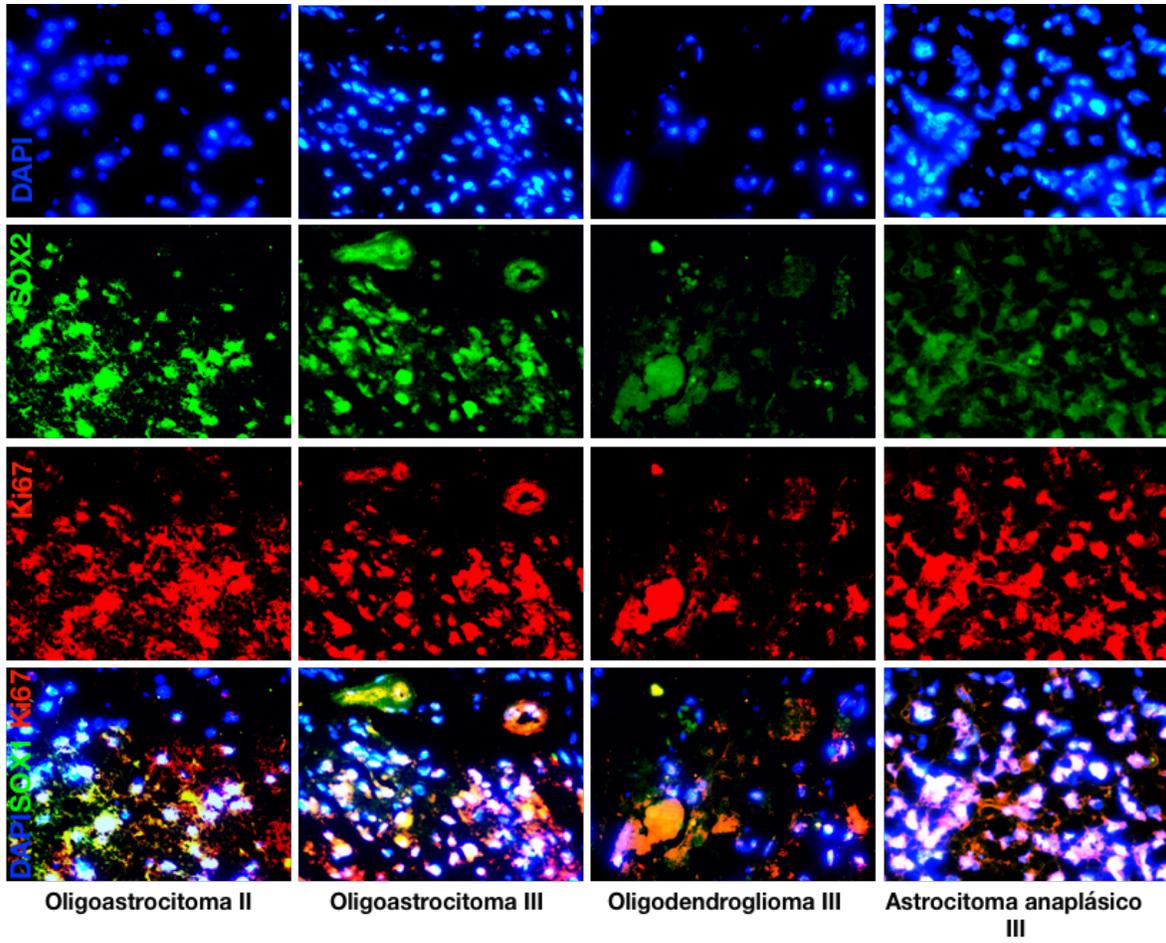
En el caso de SOX9 (**Ver Figura 11**), si bien presenta una inmunopositividad marcada en comparación con SOX1, aparenta tener menor correlación conforme incrementa el grado histopatológico, demostrando un marcaje importante para tumores de estirpe glial, no así con el oligodendroglioma, cuya fluorescencia aparenta ser menor.

**Figura 9.** Se observan microfotografías (40X) mediante la técnica de inmunofluorescencia, donde se aprecia SOX1, Ki67, DAPI y el traslape para diversos grados histológicos de tumores gliales. Se identifica una relación creciente en la presencia de dichos marcadores en función de un mayor grado histopatológico.



**Figura 10.** Se observan microfotografías (40X) mediante la técnica de inmunofluorescencia, donde se aprecia SOX2, Ki67, DAPI y el traslaje para diversos grados histológicos de tumores gliales. La fluorescencia es franca en comparación con SOX1.

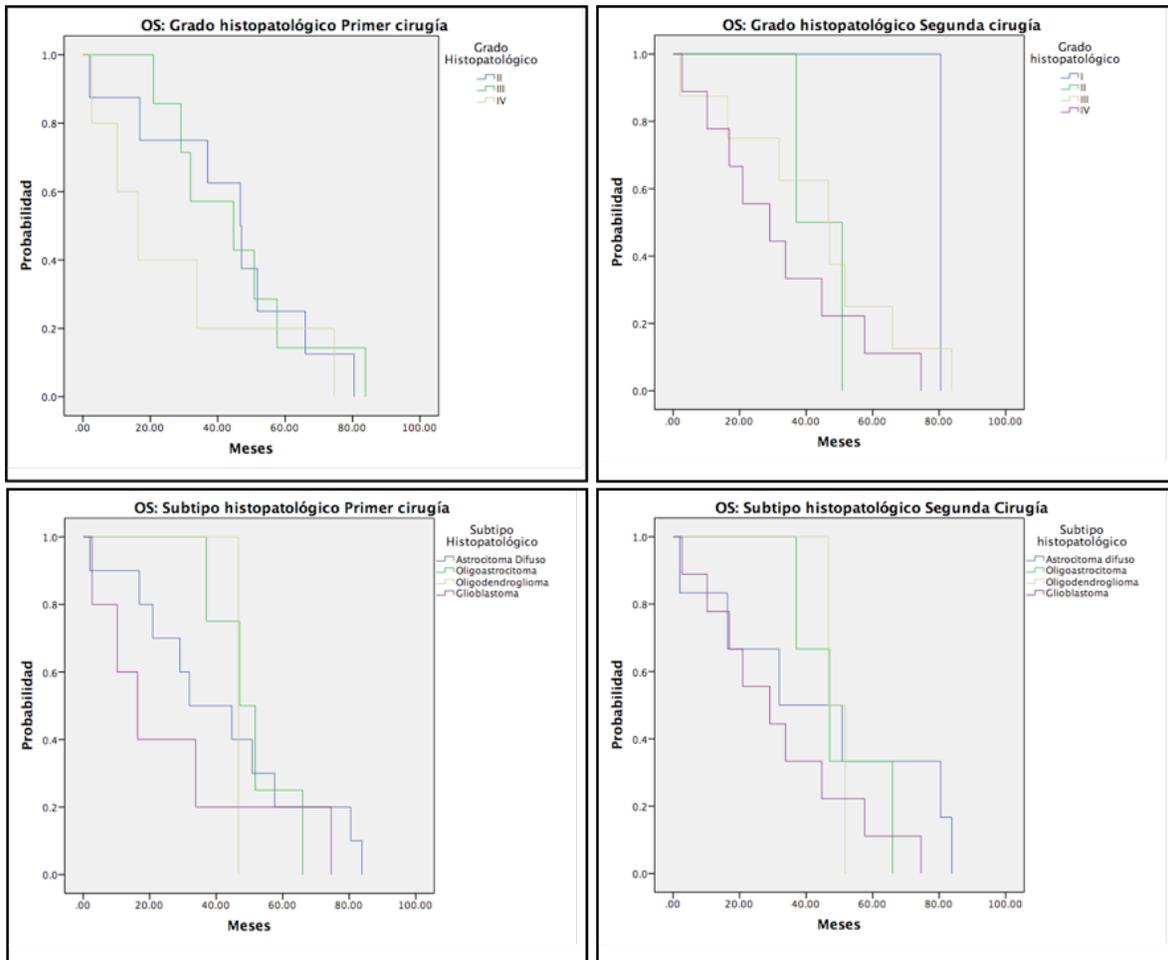




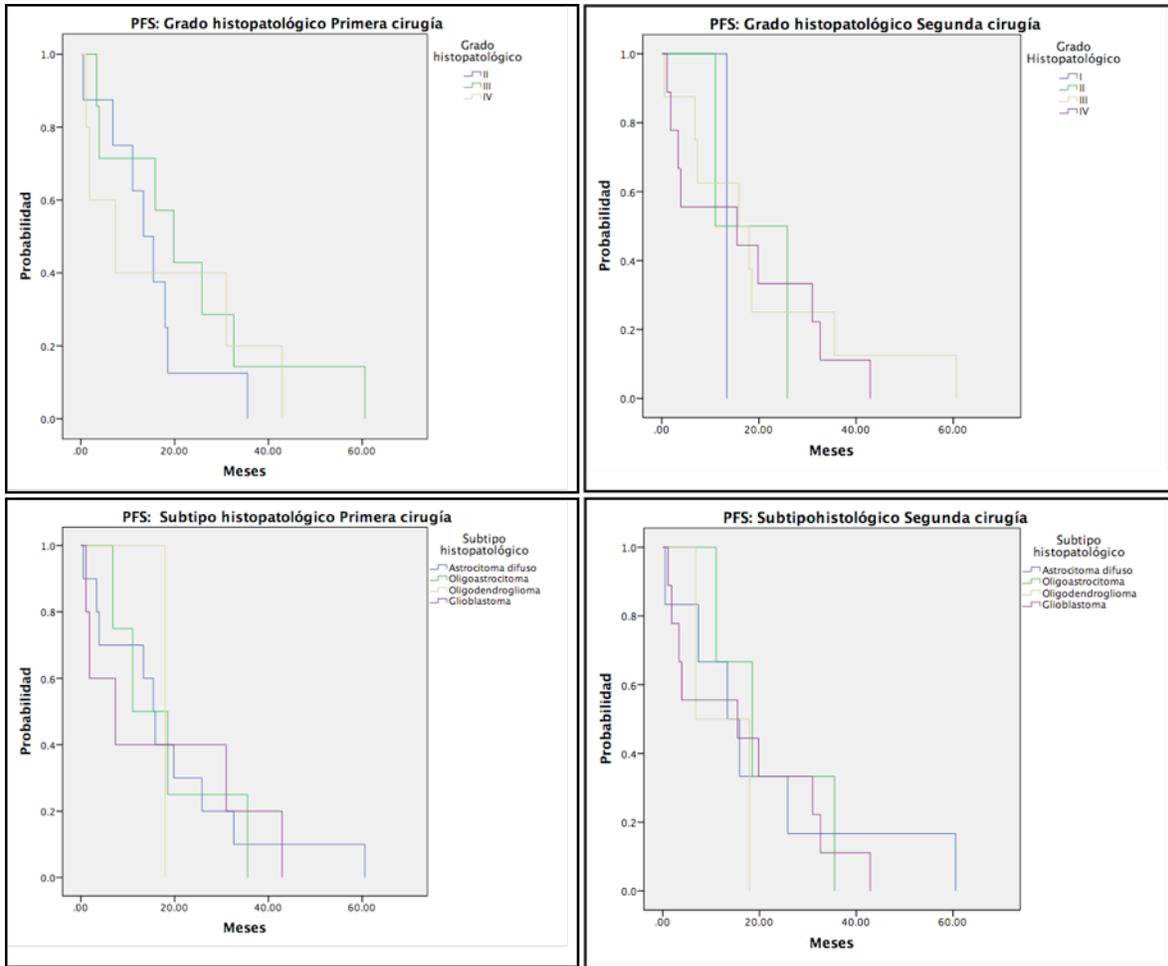
**Figura 11.** Se observa el marcaje para Ki67 y SOX9 en muestras de tejido de diversos grados tumorales. Si bien el marcaje es más intenso, éste aparenta ser menos específico para un mayor grado histopatológico.

Análisis de sobrevida para PFS y OS de acuerdo al grado histológico y subtipo histológico.

En el presente estudio, el análisis retrospectivo permitió un seguimiento de 83 meses. El análisis de sobrevida mediante las curvas de Kaplan Meier para OS (Ver **Figura 12**) en relación al grado histopatológico (I-IV) y el subtipo histopatológico para la primera cirugía y reintervención no mostraron diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a la prueba Log Rank. Misma situación ocurrió para el análisis de PFS (Ver **Figura 13**).



**Figura 12.** Curvas de Kaplan Meier para OS de acuerdo a grado histopatológico y subtipo histopatológico para la primera cirugía y la reintervención.



**Figura 13.** Curvas de Kaplan Meier para PFS de acuerdo a grado histopatológico y subtipo histopatológico para la primera cirugía y la reintervención.

La media de OS global fue de  $40.2 \pm 24.6$  meses y la media de PFS global fue de  $18.26 \pm 15.8$  meses.

*Correlación entre expresión de IDH1, Ki67, SOX1, SOX2, SOX9 con PFS y OS.*

Se muestra en la **Tabla 7** el análisis de correlación entre SOX1, SOX2, SOX9, IDH y Ki67 respecto a OS y PFS. Se encontró un coeficiente r de Pearson de -0.609 para SOX1 y OS, el cual mostró significancia estadística ( $p=0.047$ ), lo cual traduce que existe una correlación inversamente proporcional entre ambas variables, es decir, a medida que SOX1 incrementa el OS disminuye. Si bien no alcanzó la significancia estadística ( $p=0.122$ ), SOX2 en relación a OS mostró un coeficiente rho de Spearman de -0.522, lo cual se interpreta de forma muy similar al caso de SOX1. Si bien no fue uno de los objetivos planteados en nuestra metodología, observamos una correlación positiva entre SOX1 en relación a SOX2 y entre SOX1 en relación a SOX9 con un coeficiente de correlación r de Pearson de 0.665 ( $p=0.036$ ) y de 0.883 ( $p=0.004$ ), respectivamente.

**Tabla 7. Análisis de correlación entre IDH1, SOX1, SOX2, SOX9 y Ki67 cuantificados a partir del tejido obtenido de la primera cirugía y de la reintervención en relación a OS y PFS.**

	Coefficiente para OS	p	Coefficiente para PFS	p
IDH1	0.158 <sup>a</sup>	0.664	-0.131 <sup>a</sup>	0.719
SOX1	<b>-0.609<sup>a</sup></b>	<b>0.047</b>	-0.338 <sup>a</sup>	0.309
SOX2	-0.522 <sup>b</sup>	0.122	0.031 <sup>b</sup>	0.933
SOX9	-0.172 <sup>a</sup>	0.684	-0.492 <sup>a</sup>	0.216
Ki67	-0.104 <sup>b</sup>	0.592	-0.103 <sup>b</sup>	0.596

<sup>a</sup>Coefficiente de correlación r de Pearson.

<sup>b</sup>Coefficiente de correlación rho de Spearman

## 10) DISCUSIÓN

Como cualquier estudio observacional retrospectivo, el presente trabajo no esta exento de sesgo o de variables confusoras que afecten la interpretación de los resultados, no obstante se mencionan a continuación las estrategias utilizadas para minimizar ambas situaciones. Hasta la fecha nuestra institución no realiza de manera rutinaria la identificación de la mutación IDH1/2, ni de la codelección 1p/19q o el grado de metilación del promotor de la enzima MGMT, por lo que el estudio histopatológico del tejido obtenido a partir de la cirugía solo se limitó a asignar un grado, con las desventajas que esto implica<sup>6</sup>. Si bien esto pudo traer como consecuencia una incorrecta agrupación inicial de patologías con pronósticos distintos dentro del mismo grado, el diseño de nuestro estudio permitió la comparación retrospectiva de los hallazgos en el análisis de la muestra obtenida a partir de la reintervención con la obtenida a partir de la primera cirugía. No obstante, encontramos que un 75% de gliomas grado II y 57.1% de los gliomas grado III mostraron una transformación a un grado histopatológico mayor. Lo anterior esta explicado bien por la propensión de los astrocitomas IDH1/2 mutados a incrementar su grado histopatológico<sup>7</sup> (de ahí el término tumores secundarios), ya que las 12 muestras analizadas en este estudio fueron IDH1 positivas; o bien, a un sesgo de detección en donde la información clínica en el momento del análisis del tejido de la reintervención, junto con sus características histopatológicas orillarían al neuropatólogo a reclasificar el diagnóstico.

Si bien en la más reciente clasificación de la Organización Mundial de la Salud se prefiere la visualización de la codelección 1p/19q mediante la técnica de FISH para el análisis molecular y subclasificación<sup>3</sup>, en nuestro estudio esto no fue posible debido a que el tejido se fija en formol y se incluye en parafina para su almacenamiento. En una etapa complementaria realizaremos una subclasificación de los tumores de acuerdo al

estado de ATRX, fundamentados en lo publicado por Reuss<sup>11</sup>, quien encontró que en pacientes con ATRX perdido sólo 2 de 167 presentaron la codelección 1p/19q, de tal modo que diferenciamos un astrocitoma difuso, IDH mutado ATRX perdido, de un oligodendroglioma IDH mutado ATRX conservado, con un peor y mejor pronóstico clínico, respectivamente<sup>5</sup>. A pesar que en nuestra serie sólo dos casos fueron diagnosticados con tumores oligodendrogiales, su sobrevida de 6.8 y 17.9 meses, contrasta con la sobrevida de hasta 13 años reportada en la literatura<sup>9</sup>, por lo que podemos hipotetizar que se haya tratado de un diagnóstico histopatológico incorrecto.

Para el futuro análisis del resto de las muestras de tejido en una etapa complementaria, habrá que considerar que la inmunohistoquímica sólo detecta las mutaciones más frecuentes para IDH1, p.R132H y para IDH2, p.R172H<sup>5</sup>, por lo que es importante considerar que cierta proporción de los pacientes que resulten IDH1/2 negativos podrán ser falsos negativos, ya que hasta 25% de astrocitomas grado II y 12.5% de astrocitomas grado III pueden manifestar mutaciones no canónicas identificadas únicamente mediante secuenciación génica<sup>8</sup>.

Nuestra población mostró una edad promedio al diagnóstico de 36.7 años, que si bien es menor a la reportada en otras series<sup>1,56</sup>, pudo en parte explicar el adecuado estado funcional prequirúrgico para la reintervención independientemente del grado histopatológico, ya que se ha descrito que pacientes con diagnóstico de glioblastoma presentan un peor estado funcional prequirúrgico<sup>14</sup>. Misma situación ocurriría al explicar la mayor frecuencia de pacientes con tumores IDH mutados en nuestra serie, ya que se sabe que estos pacientes presentan una menor edad de presentación en contraste con los tumores IDH nativos, en promedio 35-40 años<sup>6,7</sup>.

En relación a la indicación de reintervención, en nuestra institución KPS, comorbi,

eraosdihasd

En nuestra serie, 60% de las muestras fueron diagnosticadas como lesiones grado III o IV, lo cual puede explicar que la manifestación inicial más frecuente fue la hipertensión intracraneal seguida del déficit sensitivo-motor, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura en donde dichas manifestaciones clínicas son más frecuentes en tumores de alto grado<sup>14</sup>. Es importante mencionar que 25% de los pacientes sometidos a una reintervención no mostraron síntomas clínicos, lo cual habla de la importancia del seguimiento periódico por imagen de acuerdo al algoritmo propuesto por la NCCN y la detección en función de los criterios RANO<sup>20,22</sup>.

La radioterapia se ofreció en 60% de los pacientes (5 pacientes con grado II, 4 con grado III y 3 con grado IV) en una mediana de 62 días después de la primera cirugía. En contraste, 25% de los pacientes (2 pacientes con grado II, 2 con grado III y 1 con grado IV) la recibieron en una mediana de 54 días después de la reintervención. Si bien se ha descrito que la irradiación en gliomas grado I o II puede retrasarse hasta el momento de la progresión o bien administrarse de forma temprana sin cambios en la OS<sup>24</sup>, es importante clarificar el motivo por el cual 3 pacientes con tumores de alto grado la recibieron hasta después de la reintervención. En nuestro medio, la dificultad para trasladarse a la institución por distancia o por discapacidad, así como la carencia de medios socioeconómicos podrían ser una explicación probable, no obstante, otras razones como las largas listas de espera para recibir el tratamiento deberían optimizarse. El mismo cuestionamiento debería aplicarse a aquellos 4 pacientes con lesiones de alto grado que recibieron quimioterapia en una mediana de 79 días posterior a la reintervención.

En el presente trabajo, encontramos volumen tumoral preoperatorio de 52 y 50 cc y un volumen postoperatorio de 10.5 y 6.31 cc, para la primera cirugía y la reintervención, respectivamente. Si bien se ha determinado que resecciones GTR y STR disminuyen la mortalidad en gliomas de alto grado y volúmenes residuales menores a 5 cc

umentan el PFS y OS<sup>17,18</sup>, en nuestra serie sólo 30% y 50% de los pacientes después de la primera cirugía y reintervención, respectivamente, lograron una resección mayor de 90% y sólo en 40% de todas las cirugías se lograron dichos volúmenes residuales. Dentro de las posibles explicaciones para estos hallazgos se encuentran la experiencia quirúrgica y la preferencia del cirujano hacia un tratamiento conservador, la localización anatómica quirúrgicamente compleja como el caso de tumores insulares (20% de los pacientes de nuestra serie), la proximidad a áreas elocuentes representada indirectamente con el 20% de los pacientes que presentaron alteraciones del lenguaje o el 45% de los pacientes que presentaron déficit sensitivo-motor o las lesiones múltiples presentes en 7.5% de los pacientes. De igual forma, la limitación para solventar los costos del uso de tecnologías transoperatorias como el uso de fluoresceína, neuronavegación, resonancia magnética transoperatoria, etc., que si bien han demostrado mejorías discretas en el PFS y OS<sup>21</sup>, podría mejorar en la EOR. En el mismo tenor, encontramos que la mediana de tiempo para la realización del estudio de resonancia magnética posterior a la primera cirugía y la reintervención fue de 55 (15-180) y 110 (31-236) días, a pesar de la recomendación para efectuar volumetría dentro de las primeras 72 horas del postoperatorio<sup>20</sup>, situación que podría sobreestimar el volumen tumoral postoperatorio debido a la progresión tumoral para la fecha en la cual se realiza el estudio y por ende subestimar la EOR.

Se han descrito hasta un 20% de falsos positivos en el diagnóstico de progresión (pseudoprogresión), en relación al tiempo de realización de la resonancia magnética de seguimiento y la administración de quimio y/o radioterapia, razón por la cual se ha sugerido ser cauteloso en el diagnóstico de progresión dentro de las 12 semanas (84 días) posteriores a la administración del tratamiento adyuvante<sup>20</sup>. En el presente trabajo la mediana de PFS fue de 67.9 (19.8-127.3) semanas y el tiempo entre la primera cirugía y la administración radioterapia fue de 8.8 semanas, por lo que

podemos argumentar que aún contemplando el tiempo promedio de administración del tratamiento (4 semanas para la radioterapia) y las 12 semanas durante las cuales se puede presentar pseudoprogresión, podemos afirmar que la incidencia de este fenómeno podría ser mínima. Situación distinta podría presentarse en relación al tiempo de administración de la quimioterapia después de la primera cirugía (13 semanas), ya que la duración del tratamiento pudo oscilar entre 6 hasta 12 meses. No obstante, nuestro diseño retrospectivo disminuyó la presencia de este confusor debido a que hubo confirmación histológica de malignidad en las muestras de tejido obtenidas en la reintervención en el 100% de los casos.

Es importante mencionar que el estudio de neoplasias gliales recurrentes puede incurrir en un sesgo de selección, ya que aquellos pacientes considerados para una reintervención suelen ser aquellos con mejor KPS, como observamos en el presente estudio donde nuestros pacientes se presentaron con un KPS de 85 (70-90), con un mayor volumen tumoral, con una menor edad, etc<sup>35</sup>. A pesar de ello, se ha descrito que esos factores pronósticos han demostrado un mayor beneficio en la OS en comparación del tratamiento conservador.

En relación a los marcadores moleculares Ki67, SOX1, SOX2 y SOX9, encontramos lo siguiente: (1) no se presentaron diferencias entre los niveles de dichos marcadores obtenidos a partir del tejido de la primera cirugía en comparación con la reintervención, lo cual sugiere que estos marcadores son independientes del tratamiento adyuvante y no se modifican en el transcurso del tiempo ni en función del cambio de grado histológico, no obstante, futuros estudios se requieren para confirmar estos hallazgos mediante el análisis *in vitro* de tejidos frescos obtenidos en dos tiempos distintos; (2) si bien no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas a raíz de una muestra pequeña, se observó un incremento gradual para SOX1, SOX2 y SOX9 conforme el grado histopatológico incrementaba desde un grado

II hasta un grado IV, lo cual está en acuerdo con lo reportado en la literatura<sup>48,53,54</sup>; (3) la detección diferencial de SOX1, SOX2 y SOX9 en subtipos histológicos distintos (oligoastrocitoma y oligodendroglioma grado II y III, astrocitoma anaplásico y glioblastoma) mediante inmunofluorescencia nos permitió evidenciar una disparidad entre su inmunopositividad y el comportamiento predicho según el grado histopatológico de acuerdo a la clasificación de la OMS<sup>2</sup>, lo cual nos habla de que estos marcadores podrían ser útiles en la predicción de un comportamiento clínico por sí solos o en combinación con características morfológicas en casos donde hubiera dudas diagnósticas, ejemplo de esto fue la mayor inmunopositividad para SOX1 en un oligoastrocitoma grado II, cuyo pronóstico podría considerarse como relativamente benigno, en comparación con una menor inmunopositividad en el caso de un oligoastrocitoma anaplásico y un oligodendroglioma anaplásico, cuyo comportamiento clínico se esperaría más agresivo; (4) se evidenció una correlación positiva entre el comportamiento de SOX1 respecto a SOX2 ( $r = 0.665$ ,  $p=0.036$ ) y entre SOX1 respecto a SOX9 ( $r= 0.883$ ,  $p= 0.004$ ), lo cual traduce una sinergia o bien una redundancia en su funcionamiento, de acuerdo a lo reportado previamente<sup>48,51</sup>; (5) se observó una correlación inversa estadísticamente significativa entre SOX1 y OS ( $r= -0.609$ ,  $p=0.047$ ), lo cual habla de que independientemente del grado histopatológico asignado, mayor inmunopositividad de SOX1 podría predecir un peor pronóstico clínico, hallazgo similar al reportado por Raysi Dehcordi quien encontró una correlación inversa entre SOX2 y OS ( $r= -0.75$ ,  $p= 0.001$ )<sup>49</sup>; (6) finalmente, se observó un evidente comarcaje entre SOX1, SOX2, SOX9 y Ki67, marcador de proliferación celular, lo cual habla de la relación estrecha entre un estado de pluripotencialidad, como el de las GSC, y la proliferación celular, más evidente conforme el grado histopatológico aumenta<sup>49</sup>, como observamos en el caso de nuestros pacientes con astrocitomas anaplásicos grado III y glioblastomas grado IV.

La asociación encontrada en nuestro estudio entre grado histopatológico, comportamiento clínico de acuerdo a OS y expresión de SOX1, podría explicarse de acuerdo a lo reportado por Fang (2012), quien describió que la expresión de SOX2 regula la de otros factores de transcripción de la familia SOX, incluido SOX1, y regula a la baja a BEX1 (brain expressed X-linked 1) y BEX2 (brain expressed X-linked 2), genes con actividad supresora tumoral en muestras de glioblastoma<sup>57</sup>.

Futuros estudios *in vitro* en *in vivo*, deberán detallar los factores ambientales o genéticos involucrados en la activación de SOX1, SOX2 y SOX9 en la fase preclínica de la enfermedad, de tal forma que pueda intervenir de manera temprana a los pacientes con la finalidad de ofrecer un tratamiento curativo, hasta el momento inexistente, o bien determinar si factores como la hipoxia, *acidic stress*, agentes quimioterapéuticos como la temozolamida, pueden inducir la expresión de SOX1, SOX2, SOX9 como ha sido sugerido previamente<sup>38</sup>.

## 11) CONCLUSIONES

El presente estudio detalla el comportamiento de una cohorte retrospectiva de gliomas recurrentes en función de variables clínicas, radiológicas e histopatológicas en relación a la primera cirugía y la reintervención. Encontramos una menor edad de presentación y un mejor KPS prequirúrgico tanto para la primera cirugía como la reintervención. El porcentaje de resección tumoral mayor a 90% se logró en 30% de los pacientes intervenidos en una primera cirugía y en 50% de los pacientes reintervenidos por recurrencia. Se alcanzaron volúmenes postoperatorios menores a 5 cc en 40% de todas las cirugías. No se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de SOX1, SOX2, SOX9, IDH1 y Ki67 obtenidos a partir del tejido de la primera cirugía en comparación con la reintervención. SOX1, SOX2 y SOX9 muestran un incremento conforme mayor es el grado histopatológico y no siempre corresponden con el subtipo histopatológico asignado de acuerdo a los hallazgos morfológicos. Existe una correlación inversamente proporcional entre el grado de inmunopositividad de SOX1 y la OS. SOX1 se correlaciona con SOX2 y SOX9 sugiriendo un apoyo sinérgico o redundante. Existe una interacción entre un genotipo sugestivo de pluripotencialidad (GSC) y la proliferación celular medida a través del grado de inmunopositividad para Ki67. Futuros estudios deberán detallar los factores ambientales o genéticos involucrados en la activación de SOX1, SOX2 y SOX9 en la fase preclínica de la enfermedad, de tal forma que pueda intervenir de manera temprana a los pacientes con la finalidad de ofrecer un tratamiento curativo.

## 12) REFERENCIAS

1. Ostrom QT, Gittleman H, Fulop J, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro-Oncol*. 2015;17(suppl 4):iv1-iv62. doi:10.1093/neuonc/nov189
2. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2007;114(2):97-109. doi:10.1007/s00401-007-0243-4
3. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2016;131(6):803-820. doi:10.1007/s00401-016-1545-1
4. Horbinski C. What do we know about IDH1/2 mutations so far, and how do we use it? *Acta Neuropathol (Berl)*. 2013;125(5):621-636. doi:10.1007/s00401-013-1106-9
5. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *N Engl J Med*. 2015;372(26):2481-2498. doi:10.1056/NEJMoa1402121
6. Reuss DE, Mamatjan Y, Schrimpf D, et al. IDH mutant diffuse and anaplastic astrocytomas have similar age at presentation and little difference in survival: a grading problem for WHO. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2015;129(6):867-873. doi:10.1007/s00401-015-1438-8
7. Nobusawa S, Watanabe T, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 Mutations as Molecular Signature and Predictive Factor of Secondary Glioblastomas. *Clin Cancer Res*. 2009;15(19):6002-6007. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0715
8. Visani M, Acquaviva G, Marucci G, et al. Non-canonical IDH1 and IDH2 mutations: a clonal and relevant event in an Italian cohort of gliomas classified according to the 2016 World Health Organization (WHO) criteria. *J Neurooncol*. 2017;135(2):245-254. doi:10.1007/s11060-017-2571-0
9. Jenkins RB, Blair H, Ballman KV, et al. A t(1;19)(q10;p10) Mediates the Combined Deletions of 1p and 19q and Predicts a Better Prognosis of Patients with Oligodendroglioma. *Cancer Res*. 2006;66(20):9852-9861. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1796
10. Koschmann C, Calinescu A-A, Nunez FJ, et al. ATRX loss promotes tumor growth and impairs nonhomologous end joining DNA repair in glioma. *Sci Transl Med*. 2016;8(328):328ra28-328ra28. doi:10.1126/scitranslmed.aac8228
11. Reuss DE, Sahm F, Schrimpf D, et al. ATRX and IDH1-R132H immunohistochemistry with subsequent copy number analysis and IDH sequencing as a basis for an "integrated" diagnostic approach for adult astrocytoma, oligodendroglioma and glioblastoma. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2015;129(1):133-146. doi:10.1007/s00401-014-1370-3
12. Leeper HE, Caron AA, Decker PA, Jenkins RB, Lachance DH, Giannini C. IDH mutation,

1p19q codeletion and ATRX loss in WHO grade II gliomas. *Oncotarget*. 2015;6(30). doi:10.18632/oncotarget.4497

13. Zhao H, Wang S, Song C, Zha Y, Li L. The prognostic value of MGMT promoter status by pyrosequencing assay for glioblastoma patients' survival: a meta-analysis. *World J Surg Oncol*. 2016;14(1). doi:10.1186/s12957-016-1012-4

14. Chang SM, Parney IF, Huang W, et al. Patterns of Care for Adults With Newly Diagnosed Malignant Glioma. :8.

15. Karnofsky DA, Abelmann WH, Craver LF, Burchenal JH. The use of the nitrogen mustards in the palliative treatment of carcinoma. With particular reference to bronchogenic carcinoma. *Cancer*. 1948;1(4):634-656. doi:10.1002/1097-0142(194811)1:4<634::AID-CNCR2820010410>3.0.CO;2-L

16. Sinnaeve J, Mobley BC, Ihrle RA. Space Invaders: Brain Tumor Exploitation of the Stem Cell Niche. *Am J Pathol*. 2018;188(1):29-38. doi:10.1016/j.ajpath.2017.08.029

17. Brown TJ, Brennan MC, Li M, et al. Association of the Extent of Resection With Survival in Glioblastoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol*. 2016;2(11):1460. doi:10.1001/jamaoncol.2016.1373

18. Chaichana KL, Jusue-Torres I, Navarro-Ramirez R, et al. Establishing percent resection and residual volume thresholds affecting survival and recurrence for patients with newly diagnosed intracranial glioblastoma. *Neuro-Oncol*. 2014;16(1):113-122. doi:10.1093/neuonc/not137

19. Smith JS, Chang EF, Lamborn KR, et al. Role of Extent of Resection in the Long-Term Outcome of Low-Grade Hemispheric Gliomas. *J Clin Oncol*. 2008;26(8):1338-1345. doi:10.1200/JCO.2007.13.9337

20. Wen PY, Macdonald DR, Reardon DA, et al. Updated Response Assessment Criteria for High-Grade Gliomas: Response Assessment in Neuro-Oncology Working Group. *J Clin Oncol*. 2010;28(11):1963-1972. doi:10.1200/JCO.2009.26.3541

21. Delgado-López PD, Corrales-García EM. Survival in glioblastoma: a review on the impact of treatment modalities. *Clin Transl Oncol*. 2016;18(11):1062-1071. doi:10.1007/s12094-016-1497-x

22. Nabors LB, Portnow J, Ammirati M, et al. NCCN Guidelines Insights: Central Nervous System Cancers, Version 1.2017. *J Natl Compr Canc Netw*. 2017;15(11):1331-1345. doi:10.6004/jnccn.2017.0166

23. Gorlia T, Wu W, Wang M, et al. New validated prognostic models and prognostic calculators in patients with low-grade gliomas diagnosed by central pathology review: a pooled analysis of EORTC/RTOG/NCCTG phase III clinical trials. *Neuro-Oncol*. 2013;15(11):1568-1579. doi:10.1093/neuonc/not117

24. van den Bent MJ, Afra D, de Witte O, et al. Long-term efficacy of early versus delayed radiotherapy for low-grade astrocytoma and oligodendroglioma in adults: the EORTC 22845 randomised trial. *Lancet Lond Engl*. 2005;366(9490):985-990. doi:10.1016/S0140-6736(05)67070-5

25. Brown PD, Buckner JC, O'Fallon JR, et al. Adult patients with supratentorial pilocytic astrocytomas: a prospective multicenter clinical trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004;58(4):1153-1160. doi:10.1016/j.ijrobp.2003.09.020
26. Brandsma D, Stalpers L, Taal W, Sminia P, van den Bent MJ. Clinical features, mechanisms, and management of pseudoprogression in malignant gliomas. *Lancet Oncol*. 2008;9(5):453-461. doi:10.1016/S1470-2045(08)70125-6
27. Taal W, Brandsma D, de Bruin HG, et al. Incidence of early pseudo-progression in a cohort of malignant glioma patients treated with chemoradiation with temozolomide. *Cancer*. 2008;113(2):405-410. doi:10.1002/cncr.23562
28. Brandes AA, Franceschi E, Tosoni A, et al. MGMT promoter methylation status can predict the incidence and outcome of pseudoprogression after concomitant radiochemotherapy in newly diagnosed glioblastoma patients. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2008;26(13):2192-2197. doi:10.1200/JCO.2007.14.8163
29. Norden AD, Drappatz J, Muzikansky A, et al. An exploratory survival analysis of anti-angiogenic therapy for recurrent malignant glioma. *J Neurooncol*. 2009;92(2):149-155. doi:10.1007/s11060-008-9745-8
30. Butowski N, Chang SM. Endpoints for clinical trials and revised assessment in neuro-oncology: *Curr Opin Neurol*. 2012;25(6):780-785. doi:10.1097/WCO.0b013e328359b45e
31. Diccionario de cáncer. National Cancer Institute. <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario>. Accessed May 21, 2018.
32. Chaichana KL, Pendleton C, Chambless L, et al. Multi-institutional validation of a preoperative scoring system which predicts survival for patients with glioblastoma. *J Clin Neurosci*. 2013;20(10):1422-1426. doi:10.1016/j.jocn.2013.02.007
33. Gittleman H, Lim D, Kattan MW, et al. An independently validated nomogram for individualized estimation of survival among patients with newly diagnosed glioblastoma: NRG Oncology RTOG 0525 and 0825. *Neuro-Oncol*. September 2016:now208. doi:10.1093/neuonc/now208
34. Ening G, Huynh MT, Schmieder K, Brenke C. Repeat-surgery at Glioblastoma recurrence, when and why to operate? *Clin Neurol Neurosurg*. 2015;136:89-94. doi:10.1016/j.clineuro.2015.05.024
35. Weller M, van den Bent M, Tonn JC, et al. European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Lancet Oncol*. 2017;18(6):e315-e329. doi:10.1016/S1470-2045(17)30194-8
36. Ignatova TN, Kukekov VG, Laywell ED, Suslov ON, Vrionis FD, Steindler DA. Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia*. 2002;39(3):193-206. doi:10.1002/glia.10094
37. Antoniou A, Hébrant A, Dom G, Dumont J, Maenhaut C. Cancer stem cells, a fuzzy evolving

concept: A cell population or a cell property? *Cell Cycle*. 2013;12(24):3743-3748. doi:10.4161/cc.27305

38. Sundar SJ, Hsieh JK, Manjila S, Lathia JD, Sloan A. The role of cancer stem cells in glioblastoma. *Neurosurg Focus*. 2014;37(6):E6.

39. James CD, Carlbom E, Dumanski JP, et al. Clonal genomic alterations in glioma malignancy stages. *Cancer Res*. 1988;48(19):5546-5551.

40. Jackson EL, Alvarez-Buylla A. Characterization of adult neural stem cells and their relation to brain tumors. *Cells Tissues Organs*. 2008;188(1-2):212-224. doi:10.1159/000114541

41. Song W-S, Yang Y-P, Huang C-S, et al. Sox2, a stemness gene, regulates tumor-initiating and drug-resistant properties in CD133-positive glioblastoma stem cells. *J Chin Med Assoc*. 2016;79(10):538-545. doi:10.1016/j.jcma.2016.03.010

42. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*. 2003;63(18):5821-5828.

43. Zhang M, Song T, Yang L, et al. Nestin and CD133: valuable stem cell-specific markers for determining clinical outcome of glioma patients. *J Exp Clin Cancer Res CR*. 2008;27:85. doi:10.1186/1756-9966-27-85

44. Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev*. 2003;17(1):126-140. doi:10.1101/gad.224503

45. Pevny L, Placzek M. SOX genes and neural progenitor identity. *Curr Opin Neurobiol*. 2005;15(1):7-13. doi:10.1016/j.conb.2005.01.016

46. Zhao S, Nichols J, Smith AG, Li M. SoxB transcription factors specify neuroectodermal lineage choice in ES cells. *Mol Cell Neurosci*. 2004;27(3):332-342. doi:10.1016/j.mcn.2004.08.002

47. Garros-Regulez L, Garcia I, Carrasco-Garcia E, et al. Targeting SOX2 as a Therapeutic Strategy in Glioblastoma. *Front Oncol*. 2016;6. doi:10.3389/fonc.2016.00222

48. Garcia I, Aldaregia J, Marjanovic Vicentic J, et al. Oncogenic activity of SOX1 in glioblastoma. *Sci Rep*. 2017;7:46575. doi:10.1038/srep46575

49. Raysi Dehcordi S, Ricci A, Di Vitantonio H, et al. Stemness Marker Detection in the Periphery of Glioblastoma and Ability of Glioblastoma to Generate Glioma Stem Cells: Clinical Correlations. *World Neurosurg*. 2017;105:895-905. doi:10.1016/j.wneu.2017.05.099

50. Miconi G, Palumbo P, Raysi Dehcordi S, et al. Immunophenotypic Characterization of Human Glioblastoma Stem Cells: Correlation With Clinical Outcome: HUMAN GLIOBLASTOMA STEM CELLS AND CLINICAL OUTCOME. *J Cell Biochem*. 2015;116(5):864-876. doi:10.1002/jcb.25043

51. Wegner M. All purpose Sox: The many roles of Sox proteins in gene expression. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42(3):381-390. doi:10.1016/j.biocel.2009.07.006

52. Chew L-J, Gallo V. The Yin and Yang of Sox proteins: Activation and repression in development and disease. *J Neurosci Res.* 2009;87(15):3277-3287. doi:10.1002/jnr.22128
53. Ma Y-H, Mentlein R, Knerlich F, Kruse M-L, Mehdorn HM, Held-Feindt J. Expression of stem cell markers in human astrocytomas of different WHO grades. *J Neurooncol.* 2008;86(1):31-45. doi:10.1007/s11060-007-9439-7
54. Wang L, He S, Yuan J, et al. Oncogenic role of SOX9 expression in human malignant glioma. *Med Oncol.* 2012;29(5):3484-3490. doi:10.1007/s12032-012-0267-z
55. de la Rocha AMA, Sampron N, Alonso MM, Matheu A. Role of SOX family of transcription factors in central nervous system tumors. *Am J Cancer Res.* 2014;4(4):312.
56. Gramatzki D, Dehler S, Rushing EJ, et al. Glioblastoma in the Canton of Zurich, Switzerland revisited: 2005 to 2009: Glioblastoma: An Epidemiological Study. *Cancer.* 2016;122(14):2206-2215. doi:10.1002/cncr.30023
57. Fang X, Yoon J-G, Li L, et al. The SOX2 response program in glioblastoma multiforme: an integrated ChIP-seq, expression microarray, and microRNA analysis. *BMC Genomics.* 2011;12(1):11.