



# **UNIVERSIDAD DE MURCIA**

## **ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**

**Infiltración Peritumoral en Glioblastomas Multiformes,  
Estudio de la Angiogénesis Tumoral mediante Correlación  
Inmuno-Histo-Radiológica**

**D<sup>a</sup> Ana Azahara García Ortega**

**2018**





# **UNIVERSIDAD DE MURCIA**

## **ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**

Infiltración peritumoral en glioblastomas multiformes,  
estudio de la angiogénesis tumoral mediante  
correlación inmuno-histo-radiológica

**Ana Azahara García Ortega**

Directores:

Salvador Martínez Pérez

Victoria Vázquez Sáez

2018





D. Salvador Martínez Pérez , Catedrático de Universidad del Área de Anatomía y Embriología Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad Miguel Hernández de Elche en el Departamento de Histología y Anatomía, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Infiltración peritumoral en glioblastomas multiformes, estudio de la angiogénesis tumoral mediante correlación inmuno-histo-radiológica", realizada por D. Ana Azahara García Ortega, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 16 de abril de 2018





Da. Victoria Vázquez Sáez, Doctora de la Universidad de Murcia del Área de Radiología y Medicina Física en el Departamento de Dermatología, Estomatología y Radiología y Medicina Física, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Infiltración peritumoral en glioblastomas multiformes, estudio de la angiogénesis tumoral mediante correlación inmuno-histo-radiológica", realizada por D. Ana Azahara García Ortega, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 16 de abril de 2018







*“Vuelve tu rostro hacia el sol y las sombras caerán detrás de ti.” (proverbio maorí)*



# AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis Salvador Martínez por darme la oportunidad de participar en este proyecto y contagiarme la ilusión por la investigación. Me considero una gran afortunada por haber podido trabajar con él.

A mi directora Victoria Vázquez por guiarme en el camino y por pensar en mí desde el principio. Te agradezco tu confianza y tu apoyo, sin tí esto no hubiera sido posible.

A Juan Gómez no tengo palabras para agradecerle el tiempo y la dedicación en esta tesis. Hemos pasado juntos muchas tardes de estadística que no voy a olvidar. He aprendido de él como profesional y como persona, y su buen hacer han quedado reflejados en este trabajo.

A mi tutora Pilar Aroca por ayudarme y estar ahí siempre que la he necesitado.

A mi primo Luis, por su generosidad al ayudarme a recoger las muestras, con todo lo que ello conllevaba. Es bonito tener a la familia cerca de una forma tan incondicional.

Al resto de mis compañeros del servicio de Radiología del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, tanto adjuntos como residentes, que de alguna forma han colaborado en esta tesis. Especialmente a todo el equipo profesional y humano de la unidad de radiología de mama con el que convivo diariamente.

Al Servicio de Neurocirugía de la Arrixaca por la colaboración y predisposición ofrecida desde el principio.

A la doctora Teresa Escámez de Biobanco y a su equipo, por ayudarnos en el almacenamiento y procesamiento de las muestras.

A todos los trabajadores del IMIB, y especialmente a Loli Riquelme, por todo el tiempo que han dedicado a este proyecto.

A todos los pacientes que aceptaron participar en el estudio y que veían en nuestro trabajo una esperanza para el futuro. A ellos va dedicado especialmente esta tesis, por la valentía y el coraje con el que se enfrentaron a esta terrible enfermedad.

Espero y confío que la cura del cáncer esté más cerca de lo que imaginamos.

A mis padres y a mi hermano por ser para mí un referente tanto en lo profesional como en lo personal.

A Juan, por ser el mejor compañero de estudio y de viaje, y por todo lo bueno que aún está por llegar...

A todos, muchas gracias.

*“Tus fuerzas naturales, las que están dentro de ti, serán las que curarán tus enfermedades.”*

Hipócrates



## ABREVIATURAS

ATRX: Alpha Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X- linked  
ADC: apparent diffusion coefficient  
ADEM: Acute disseminated encephalomyelitis  
ADN: ácido desoxirribonucleico  
BCNU: carmustina  
BHE: barrera hematoencefalica  
CBTRUS: Central Brain Tumor Registry of the United States.  
CHO: Colina  
CR: creatina  
DAB: diaminoencidina  
DTI: tensor de la difusión  
DWI: diffusion weighted imaging  
EC: endotelio continuo  
EGFR: epidermal growth factor receptor.  
ELA: esclerosis lateral amiotrófica  
EM: esclerosis múltiple  
EORT: European Organisation for Research and Treatment of Cancer.  
FA: fracción de anisotropía  
FISH: Fluorescence In Situ Hybridization  
FLAIR: Fluid attenuation inversion recovery  
FOV: field of view  
FSC: flujo sanguíneo cerebral  
FUBP1: Far Upstream Element Binding Protein 1  
G-CIMP: Glioma CpG Island Methylator Phenotype  
GFAP: glial fibrillary acidic protein  
GBM: Glioblastoma Multiforme  
GSC: glial stem cell  
Gy: gray  
HCUVA: Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca  
HSF: Hernia subfalciana  
HTA: Hernia transtentorial ascendente  
HTD: Hernia transtentorial descendente  
IDH 1 : isocitrato deshidrogenasa 1  
IDH 2: isocitrato deshidrogenasa 2  
i.v: intravenoso  
KPS: Karnofsky Performance Score  
Lac: lactato  
Lip: lípidos  
M: mujer  
MGMT: O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase  
MHC I: major histocompatibility complex I  
MHC II: major histocompatibility complex II

Mio: mioinositol  
MME: mini mental estatus  
MRS: multivoxel magnetic resonance spectroscopy  
MV: malformación vascular  
NAA: n-acetilaspato  
NF1: neurofibromatosis tipo 1  
NF2: neurofibromatosis tipo 2  
NG2: Neural glial antigen 2  
NOS: not otherwise specified  
OMS: Organización Mundial de la Salud  
PBS: phosphate buffered saline  
PC: pericito  
PERITM: peritumoral  
Ppm: partes por millón  
QMT: quimioterapia  
RDT: radioterapia  
RM: resonancia magnética  
ROI: region of interest  
RTOG: Radiation Therapy Oncology Group  
Sd: síndrome  
SNC: Sistema nervioso central  
TC: tomografía computerizada  
TE: tiempo de eco  
TERT: telomerase reverse transcriptase  
TM: tumoral  
TMZ: temozolamida  
TR: tiempo de repetición  
TTM: tiempo de tránsito medio  
V: varón  
VEGF: anti-vascular endothelial growth factor  
VIH: virus inmunodeficiencia humana  
VOI: voxel of interest  
VSC: volumen sanguíneo cerebral  
VSCr: volumen sanguíneo cerebral relativo

## **INDICE DE CONTENIDOS**

**RESUMEN ..... 20**

**SUMMARY ..... 22**

**1. INTRODUCCIÓN..... 26**

1.1. EPIDEMIOLOGÍA .....	26
1.2. FACTORES DE RIESGO .....	29
1.3. CLASIFICACIÓN.....	32
1.3.1. CLASIFICACIÓN DE LOS TUMORES DEL SNC SEGÚN LA OMS 2007 .....	32
1.3.2. CLASIFICACIÓN DE LA OMS 2016 .....	34
1.3.3 PRINCIPALES CAMBIOS DE LA CLASIFICACIÓN OMS TUMORES SNC DE 2016 RESPECTO A LA DE 2007 .....	41
1.4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS .....	48
1.5. DIAGNÓSTICO .....	50
1.5.1. DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO .....	50
1.5.2 DIAGNÓSTICO RADIOLÓGICO .....	51
1.5.2.1. TC.....	51
1.5.2.2. RM .....	51
1.5.2.2.1. TÉCNICAS DE RM CONVENCIONAL: .....	51
1.5.2.2.2.TÉCNICAS DE RM AVANZADA : .....	52
1.5.2.2.2.1. DIFUSIÓN.....	52
1.5.2.2.2.2. TENSOR DE LA DIFUSIÓN .....	52
1.5.2.2.2.3. PERFUSIÓN.....	53
1.5.2.2.2.4. ESPECTROSCOPIA.....	54
1.6. FACTORES PRONÓSTICOS .....	57
1.6.1. FACTORES ANATOMO-PATOLÓGICOS.....	57
1.6.2. FACTORES CLÍNICOS .....	58
1.6.3. FACTORES TERAPÉUTICOS .....	60
1.6.4. FACTORES MOLECULARES.....	61
1.7. TRATAMIENTO Y PRONÓSTICO: .....	64
1.7.1. CIRUGÍA .....	64
1.7.2. RADIOTERAPIA.....	64
1.7.3. QUIMIOTERAPIA.....	65
1.8. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.....	68
1.9. LA IMPORTANCIA DEL TEJIDO PERITUMORAL.....	69
1.9.1. HISTOLOGÍA DEL TEJIDO PERITUMORAL.....	69
1.9.1.1. MICROVASCULATURA CEREBRAL NORMAL .....	69
1.9.1.2. EL NICHOS PERIVASCULAR TUMORAL.....	71
1.9.2. ¿QUÉ SON LOS PERICITOS? .....	72
1.9.2.1. MARCADORES MOLECULARES DEL PERICITO.....	72
1.9.2.2. FUNCIONES DEL PERICITO .....	72
1.9.2.3. LOS PERICITOS EN LOS TUMORES .....	73



1.9.2.3.1. ANGIOGÉNESIS Y CRECIMIENTO TUMORAL .....	73
1.9.2.3.2. RESISTENCIA AL TRATAMIENTO.....	75
1.9.2.3.3. REGULADORES DE LA INMUNIDAD.....	75
<b>2. OBJETIVOS PREVISTOS .....</b>	<b>80</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>84</b>
3.1 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN .....	84
3.2. POBLACIÓN DE PACIENTES .....	84
3.3. CONSIDERACIONES ÉTICAS .....	86
3.4. RECOGIDA DE DATOS.....	86
3.4.1. PRIMERA FASE. ESTUDIO RADIOLÓGICO. ....	86
3.4.1.1. RM CONVENCIONAL.....	87
3.4.1.2. TÉCNICAS AVANZADAS Y PROCESADO .....	87
3.4.1.2.1. DIFUSION .....	87
3.4.1.2.2. TENSOR DE LA DIFUSIÓN (DTI) .....	88
3.4.1.2.3. ESPECTROSCOPIA MULTIVOXEL.....	90
3.4.1.2.4. PERFUSIÓN .....	94
3.4.2. SEGUNDA FASE. OBTENCIÓN DE TEJIDO PERITUMORAL EN EL QUIRÓFANO ....	95
3.4.3. TERCERA FASE: PROCESADO DEL TEJIDO. ....	97
3.4.3.1. ESTUDIO HISTOLÓGICO. OBTENCIÓN DE SECCIONES HISTOLOGICAS.....	97
3.4.3.2. INMUNOFLUORESCENCIA. ....	97
3.4.3.3. ESTUDIO INMUNO-HISTOLOGICO DE LAS MUESTRAS .....	99
3.5. ESTUDIO ESTADÍSTICO .....	102
3.5.1. VARIABLES INCLUIDAS EN EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	102
3.5.2. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA.....	104
3.5.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	104
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>108</b>
4.1. RESULTADOS DE ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA .....	108
4.1.1. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y MORFOLÓGICAS.....	108
4.1.2 CARACTERÍSTICAS DE IMAGEN EN TÉCNICAS DE RM CONVENCIONAL.....	109
4.1.3. TÉCNICAS DE RM AVANZADA.....	110
4.2. RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	112
4.2.1. COMPARACION DE MEDIAS (CONTRASTE DE IGUALDAD DE MEDIAS) ENTRE TÉCNICAS DE RM AVANZADA.....	112
4.2.1.1. DIAGRAMAS DE CAJAS. ....	113
4.2.2. ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ENTRE VARIABLES HISTOLÓGICAS.....	118
4.2.3. ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ENTRE VARIABLES HISTOLÓGICAS, RADIOLÓGICAS Y LA EDAD .....	118
4.2.4. SUPERVIVENCIA DE LOS TUMORES.....	121
4.2.4.1. ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL DE LOS PACIENTES.....	121
4.2.4.1. ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA DE LOS DATOS RADIOLÓGICOS .....	124
4.2.4.2. ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA DE LOS DATOS HISTOLÓGICOS.....	127
4.2.4.3. ANÁLISIS MULTIVARIANTE .....	131
4.2.4.3.1. ANÁLISIS MULTIVARIANTE DATOS RADIOLÓGICOS Y LA EDAD .....	131

4.2.4.3.2. ANÁLISIS MULTIVARIANTE DATOS HISTOLÓGICOS Y LA EDAD .....	132
--	-----

## **5. DISCUSIÓN ..... 136**

5.1 INFILTRACIÓN PERITUMORAL.....	136
5.1.1. INFILTRACIÓN PERITUMORAL EN RADIOLOGÍA .....	136
5.1.1.1. DIFUSIÓN .....	137
5.1.1.2. TENSOR DE LA DIFUSIÓN .....	138
5.1.1.3. PERFUSIÓN .....	139
5.1.1.4. ESPECTROSCOPIA .....	141
5.1.2. INFILTRACIÓN PERITUMORAL EN HISTOLOGÍA.....	143
5.1.2.1. GFAP .....	143
5.1.2.2. MALFORMACIÓN VASCULAR.....	143
5.1.2.3. NG2.....	144
5.1.2.4. CD68 .....	145
5.2 SUPERVIVENCIA EN GBM .....	148
5.2.1. DATOS RADIOLÓGICOS Y SUPERVIVENCIA.....	149
5.2.1.1. ADC PERITUMORAL COMO BIOMARCADOR Y FACTOR PRONÓSTICO INDEPENDIENTE .....	149
5.2.1.2. FACTORES PRONÓSTICOS RADIOLÓGICOS INDEPENDIENTES SEGÚN EL MODELO DE COX.....	150
5.2.2. DATOS HISTOLÓGICOS Y SUPERVIVENCIA .....	152
5.2.2.1. FACTORES PRONÓSTICOS HISTOLÓGICOS INDEPENDIENTES SEGÚN EL MODELO DE COX.....	153
5.3. LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	154

## **6. CONCLUSIONES ..... 158**



# RESUMEN

## INTRODUCCIÓN

El glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor maligno primario más frecuente del sistema nervioso central y el más agresivo en adultos.

La heterogeneidad histológica no está limitada sólo al tumor, sino que también se extiende al tejido peritumoral. El frente de infiltración, clásicamente poco estudiado y sin repercusión en la gradación del estadio tumoral y la toma de decisiones terapéuticas, parece un lugar clave para actuar con las nuevas terapias inmunológicas.

El tejido peritumoral se define en Resonancia Magnética (RM) como el área de cerebro alrededor del tumor, hiperintensa en secuencias potenciadas en T2 y sin realce de contraste. No obstante, necesitamos establecer la correlación anatomopatológica con las técnicas de RM avanzada para definir mejor esta área.

La supervivencia global (SG) en pacientes con GBM varía significativamente. Es esencial poder predecir la evolución mediante factores pronósticos independientes que nos permitan seleccionar la mejor terapia e incrementar la supervivencia.

## OBJETIVOS

- Valorar la infiltración peritumoral de los tumores de alto grado mediante las técnicas de RM avanzada: difusión (DWI), tensor de la difusión (DTI), espectroscopia multivoxel y perfusión.
- Valorar la alteración en la microvasculatura cerebral peritumoral en relación con los pericitos. Demostrar que los pericitos son los que condicionan la malformación vascular y no la neovascularización.
- Buscar marcadores radiológicos reproducibles en la infiltración tumoral que puedan correlacionarse con las alteraciones inmuno-histoquímicas estudiadas en la pieza quirúrgica.
- Establecer si los marcadores radiológicos en el momento del diagnóstico pueden correlacionarse con la supervivencia global.

## MATERIAL Y MÉTODOS

En 70 pacientes con GBM confirmado se realizó estudio radiológico mediante las técnicas de RM avanzada. Un neurorradiólogo experto obtuvo valores tumorales y peritumorales relativos respecto a la sustancia blanca contralateral a partir de los mapas de ADC en DWI, fracción de anisotropía (FA) en DTI, cocientes de metabolitos del espectro y volumen sanguíneo cerebral (VSC) en perfusión.

En 28 casos se seleccionó el área de mayor infiltración peritumoral radiológica y se obtuvieron muestras de tejido peritumoral en el quirófano para estudio inmuno-histológico. Las variables histológicas estudiadas fueron: infiltración perivascular de células tumorales GFAP positivas (proteína gliofibrilar ácida), malformación vascular (MV) como vasos tortuosos con aspecto glomeruloide, presencia de células NG2 inmunopositivas (pericitos) en la pared vascular e infiltración de células con carácter macrófago (inmunopositivas para CD68) en el parénquima peritumoral.

Se realizó un análisis estadístico de las variables radiológicas e histológicas.

## RESULTADOS

Las técnicas de RM avanzada son capaces de valorar la infiltración peritumoral, al diferenciar el tejido tumoral del peritumoral de forma estadísticamente significativa, a excepción del cociente colina / creatina (CHO / CR), que no obstante podría ayudarnos a delimitar el frente de infiltración.

Las alteraciones de la microvasculatura cerebral detectadas en la pieza quirúrgica han demostrado tener una correlación significativa entre los marcadores histológicos de MV y GFAP con el marcador NG2 o pericito, por lo tanto podemos postular que los cambios histológicos en el frente infiltrativo estarían condicionadas por el pericito.

Los marcadores radiológicos que presentaron correlación con las alteraciones detectadas en la pieza quirúrgica fueron: GFAP con ADC tumoral y peritumoral relativos (r) como marcadores de infiltración, MV con VSCr tumoral y cociente CHO/CR peritumoral, NG2 con VSCr tumoral y lípidos peritumorales y el CD68 con VSCr tumoral y el cociente colina/N-acetilaspártato (CHO/NAA) peritumoral.

Los marcadores que resultaron ser factores pronósticos independientes respecto a la supervivencia fueron: de las variables radiológicas el ADCr peritumoral, el cociente CHO/NAA peritumoral y los valores normalizados de lípidos tumorales a 1.3ppm, y de las variables histológicas, el GFAP y la malformación vascular. La edad también resultó ser un factor pronóstico independiente.

# SUMMARY

## INTRODUCTION

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most aggressive and frequent primary malignant tumor of the central nervous system in adults.

The histological heterogeneity of GBM is not limited to the tumor, but also extends to the peritumoral tissue. Actually, the tumor infiltration front, classically under-studied and without repercussion in the stage gradation and therapeutic decision making, seems to be a key place to understand GBM growth and a target for new immunological-based therapies.

The peritumoral tissue is defined in Magnetic Resonance (MR) as the brain area around the tumor, hyperintense in T2WI sequences and without contrast enhancement. However, we need to define correlation between pathology and advanced MR techniques to better define this area.

Overall survival (OS) in patients with GBM varies significantly. It is essential to be able to predict the evolution by independent prognostic factors that allow us to select the best therapy and increase survival.

## OBJECTIVES

- To evaluate the peritumoral infiltration of high-grade tumors according to advanced MR imaging techniques: diffusion weighted imaging (DWI), diffusion tensor imaging (DTI), multivoxel spectroscopy and perfusion weighted imaging.
- To assess the alteration in the peritumoral cerebral microvasculature with respect to the pericytes. To study the role of pericytes in vascular malformation.
- Search for reproducible radiological markers in tumor infiltration that can be correlated with the immunohistochemical alterations studied in the surgical specimen.
- To know if radiological markers at the time of diagnosis can be correlated with the overall survival of GBM patients.

## MATERIAL AND METHODS

In 70 patients with confirmed GBM, radiological study was performed using advanced MR techniques. Relative tumor and peritumoral values were obtained with respect to the contralateral white matter and applied to maps of apparent diffusion coefficient (ADC) in DWI, fractional anisotropy (FA) in DTI, multiple metabolite ratios and cerebral blood volume (CBV) in perfusion weighted imaging.

In 28 cases, the area of greatest radiological peritumoral infiltration was selected and peritumoral tissue samples were obtained during surgery for immunohistochemical study. The histological variables studied were: perivascular infiltration of GFAP tumor cells (glial fibrillary acidic protein), vascular malformation (VM) as tortuous vessels with glomeruloid appearance, presence of immunopositive NG2 cells (pericytes) in the vascular wall and infiltration of macrophage cells (immunopositive for CD68) in the peritumoral parenchyma.

A statistical analysis of the radiological and histological variables was performed.

## RESULTS

The advanced MR techniques are able to identify the peritumoral infiltration, by differentiating the tumor tissue from the peritumoral tissue significantly, except for the choline / creatine ratio (CHO / CR) which could nevertheless help us to delimit the infiltration front.

Alterations of the cerebral microvasculature detected in the surgical specimen have shown significant correlation between histological markers of VM and GFAP and the NG2 marker or pericyte; therefore, we can postulate that these histological changes would be conditioned by the pericyte.

The radiological markers that correlated with the alterations detected in the surgical specimen were: GFAP with tumoral and peritumoral relative (r) ADC values as infiltration markers, VM with tumoral rCBV and peritumoral CHO / CR ratio, NG2 with tumoral rCBV and peritumoral normalized values of lipids and CD68 with tumoral rCBV and peritumoral choline / N-acetylaspartate (CHO / NAA) ratio.

Markers that turned out to be independent prognostic factors for survival were: from the radiological variables the peritumoral rADC values, the peritumoral CHO / NAA ratio and the normalized values of tumor lipids at 1.3ppm, and from the histological variables, the GFAP and the VM. Age also turned out to be an independent prognostic factor.

# INTRODUCCIÓN



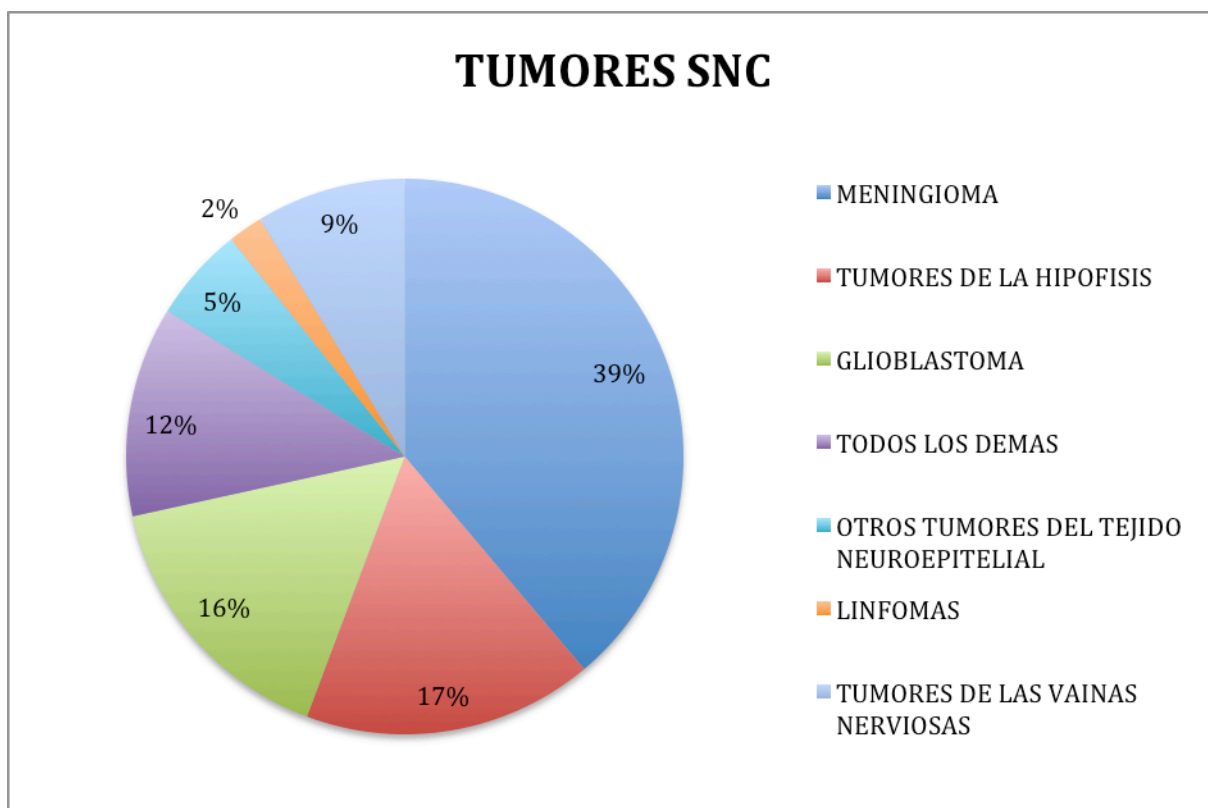


# 1. INTRODUCCIÓN

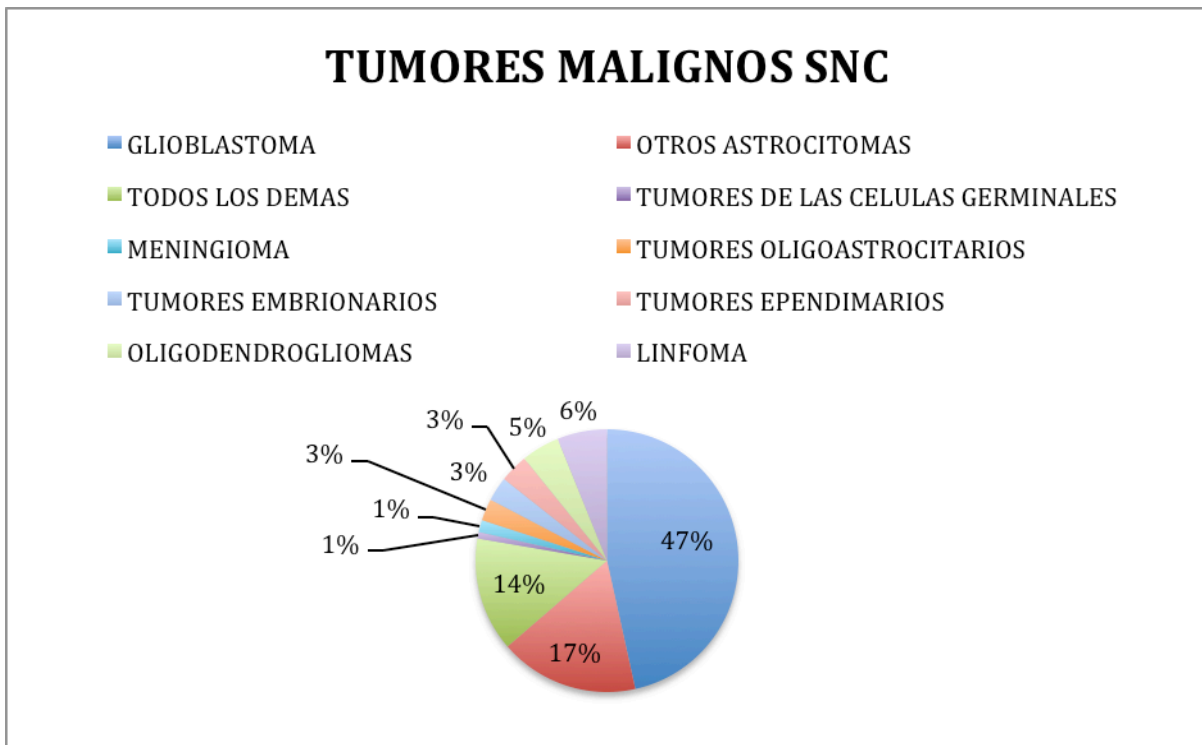
## 1.1. EPIDEMIOLOGÍA

El registro más utilizado para conocer la incidencia de los tumores cerebrales es el CBTRUS (Central Brain Tumor Registry of the United States/ Registro de los tumores cerebrales de Estados Unidos) que recoge datos del Centro de Control y Prevención de Enfermedades, del Programa Nacional de Registro del Cáncer y del Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos.

Según el último informe (periodo de 2009 a 2013)<sup>1</sup>, el glioblastoma multiforme es la tercera neoplasia más frecuente del SNC (14,9%). Las otras dos neoplasias más frecuentes son el meningioma (36.6%), seguido de los tumores de la hipófisis (15.9%).



**FIGURA 1.1.** Distribución de los tumores cerebrales primarios y otros tumores del SNC según análisis estadístico del CBTRUS (N=368,117) en el período de 2009-2013<sup>1</sup>.



**FIGURA 1.2. Distribución de los gliomas primarios del SNC según subtipo histológico. Datos a partir del informe estadístico CBTRUS (N=99,165) en el período de 2009-2013<sup>1</sup>.**

El GBM es el tumor maligno primario más frecuente, ya que representa el 46.6% de éstos y el 55,4% de todos los gliomas.

La tasa de incidencia es de 3,20 casos/100.000 habitantes-año, siendo mayor la incidencia en hombres (3,98) que en mujeres (2,53).

Es más común en adultos mayores y menos frecuente en niños, ya que estos tumores representan tan sólo un 2.9% del total de los tumores cerebrales del SNC en el grupo de población de 0-19 años.

La mediana de edad al diagnóstico son 64 años.

El GBM es 1,57 veces más común en hombres y es también 1,93 veces más frecuente en la población blanca que en la afroamericana.

La supervivencia relativa para glioblastoma es bastante baja, tan sólo el 5,5% de los pacientes están vivos a los cinco años del diagnóstico. La supervivencia relativa son más altas en el pequeño grupo de paciente que son diagnosticados por debajo de los 20 años.

### ESPAÑA

En España, según los datos del conjunto de registros de cáncer, los tumores primarios del SNC representan un 2% del total de cáncer en adulto, lo que indica que se trata de tumores poco frecuentes. La incidencia anual de tumores cerebrales en España es de 2.000 casos, de los que un 60% son gliomas malignos. La incidencia anual de glioma de alto grado es aproximadamente de 2,4 por 100.000 adultos. Según los datos del área de epidemiología ambiental y cáncer del Centro Nacional de Epidemiología del Instituto Carlos III <sup>2</sup> en el año 2006 se produjeron 1387 defunciones, con una edad promedio a la defunción de 61.58 años y una tasa por 100,000 habitantes de 5.70 casos en hombres y 3.72 casos en mujeres.

Según los resultados de un estudio de registro realizado en la provincia de **Girona** <sup>3</sup> en una población de pacientes con tumores primarios malignos y no malignos del SNC (n= 2131) desde 1994 a 2013, las histologías reportadas más frecuentes fueron el meningioma (27.6%; IR = 5.11) y el glioblastoma (22.2%; IR = 4.15). En la distribución respecto al sexo, el glioblastoma multiforme también fue más frecuente en hombres, 1,47 veces más. La supervivencia relativa a los cinco años del diagnóstico fue tan sólo del 3,7%, un valor similar al que proporcionan los datos de registro europeos (EUROCARE working group) <sup>4</sup>.

### REGIÓN DE MURCIA

A través de la página web del Servicio de Epidemiología de la Región de Murcia <http://www.murciasalud.es/seccion.php?idsec=1074> se pueden consultar el Registro de Mortalidad y el Registro de Cáncer para el glioblastoma multiforme.

La información de mortalidad por cáncer está agregada para tumores del sistema nervioso central. El Glioblastoma multiforme está incluido en el código CIE-10 que corresponde a C71- neoplasias malignas de cerebro <sup>5</sup>.

Las estadísticas de mortalidad consultadas en la región de Murcia en el año 2015 (último disponible) a través del registro de mortalidad indican que de los casos C71 hubo 79 fallecimientos, disponible en [http://econet.carm.es/web/crem/inicio/crem/sicrem/PU\\_mortalidadBasica/E15/sec10\\_sec10\\_2.html](http://econet.carm.es/web/crem/inicio/crem/sicrem/PU_mortalidadBasica/E15/sec10_sec10_2.html).

La información de incidencia de cáncer en la Región de Murcia, que son los casos nuevos que se diagnostican cada año, está disponible también en <http://www.murciasalud.es/seccion.php?idsec=1074>. En el año 2010 en la Región de Murcia se diagnosticaron 132 casos de tumores del cerebro o sistema nervioso central, de los que 35 casos corresponden a glioblastoma multiforme (datos propios del registro de cáncer). En los años posteriores hay una media anual comprendida entre 30 y 40 casos de glioblastoma multiforme [http://www.murciasalud.es/recursos/ficheros/389096-Febrero\\_2017](http://www.murciasalud.es/recursos/ficheros/389096-Febrero_2017).

### 1.2. FACTORES DE RIESGO

La etiología del GBM es desconocida. Los factores predisponentes son escasamente conocidos.<sup>6</sup>

- **EDAD**

Puede ocurrir a cualquier edad, aunque el pico de incidencia se localiza entre los 45 y los 70 años, con un pico máximo a los 58 años. Sólo un 8.8% de los niños con tumores del SNC tienen GBM y los casos congénitos son extremadamente raros<sup>7</sup>. Según el CTBRUS la incidencia del glioblastoma aumenta con la edad, con los índices más altos entre 75 y 84 años<sup>1</sup>.

La edad avanzada al diagnóstico representa el factor pronóstico de supervivencia más pobre en todos los grupos de edad de GBM<sup>8</sup>.

- **RAZA**

Los caucásicos se afectan más frecuentemente que los asiáticos o africanos<sup>9, 10, 11</sup>.

El registro Central de Tumores Cerebrales de Estados Unidos (CBTRUS) indica que la incidencia de glioblastomas y otros gliomas son aproximadamente el doble en personas de raza blanca que afroamericanos, mientras que la incidencia de otros tumores como los meningiomas, linfomas, tumores hipofisarios y craneofaringiomas no muestran diferencias significativas respecto a la raza<sup>12</sup>.

- **FACTORES MEDIOAMBIENTALES**

#### RADIACIÓN IONIZANTE

El único factor de riesgo medioambiental demostrado para los gliomas es la exposición a radiación ionizante terapéutica (GBM radioinducido)<sup>13</sup>.

Muchos estudios han demostrado el incremento de los tumores cerebrales (gliomas, tumores primitivos neuroectodérmicos PNETS) en niños que recibieron radiación ionizante como tratamiento de la leucemia aguda linfoblástica<sup>14, 15, 16, 17, 18, 19, 20</sup>.

En el caso de los gliomas, el exceso de riesgo relativo era más alto entre niños expuestos a una edad menor de cinco años. Este mayor riesgo en niños expuestos a edades tan tempranas podría reflejar una mayor susceptibilidad del cerebro en desarrollo a la radiación<sup>21</sup>. Incluso dosis terapéuticas bajas para el tratamiento de la tiña capitis podrían condicionar el desarrollo de tumores cerebrales<sup>22, 23</sup>.

#### CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS

La exposición a radiación no ionizante no está demostrada, aunque en un estudio reciente se relaciona el tiempo de uso del teléfono móvil con el riesgo de padecer un tumor cerebral<sup>24</sup>.

#### OCUPACIÓN. EXPOSICIÓN QUÍMICA.

Se han sugerido otros factores de riesgo tales como la exposición a carcinógenos

químicos (trabajadores del caucho, petróleo, pesticidas, trabajo forestal, y servicios de limpieza) así como la exposición pasiva al tabaco, aunque ninguno de estos factores se consideran aún causas probadas <sup>25</sup>.

- **SÍNDROMES ASOCIADOS A GBM**

Alrededor del 5% de los GBM presentan agregación familiar y puede formar parte de síndromes tumorales hereditarios raros como la neurofibromatosis tipo 1 y tipo 2, y el síndrome de Li-fraumeni por la mutación del p53 <sup>26</sup>. También se ha descrito en procesos poco frecuentes como el Síndrome de Turcot, la enfermedad de Ollier, el síndrome de Maffucci y la enfermedad de Von-Hipel-Lindau.

El **Síndrome Li-Fraumeni** es una enfermedad con herencia autosómica dominante que se caracteriza por múltiples neoplasias primarias en niños y adultos jóvenes, con una predominancia de sarcomas de tejidos blandos, osteosarcomas, cáncer de mama, y un incremento en la incidencia de tumores cerebrales (los más frecuentes son los gliomas astrocitarios), leucemias y adenomas suprarrenales. El 70% de los casos de Li-Fraumeni tienen una mutación de P53 <sup>27</sup>.

El **síndrome de Turcot** es una enfermedad con herencia autosómica dominante caracterizada por pólipos adenomatosos colorrectales o cáncer de colon y tumores neuroepiteliales malignos. Los pacientes con síndrome de Turcot tipo 1 presentan mutaciones en genes de reparación del ADN como el hPMS2, hMSH2 o hMLH1 y presentan glioblastoma y carcinoma colorrectales. Mientras que los pacientes con sd Turcot tipo 2 presentan una mutación en el gen APC y sufren de poliposis adenomatosa familiar y desarrollan típicamente meduloblastomas <sup>28</sup>.

La neurofibromatosis es una enfermedad autosómica dominante.

La **neurofibromatosis tipo 1 (NF1)** tiene una prevalencia de 1/3000 nacimientos <sup>29</sup>. Se caracteriza por manchas café con leche, pecas axilares e inguinales, así como múltiples neurofibromas, tumores malignos de las vainas nerviosas y gliomas del nervio óptico (el más frecuente el astrocitoma pilocítico) <sup>30</sup>. Además se aprecian otros gliomas como astrocitomas difusos y glioblastomas.

La **neurofibromatosis tipo 2 (NF2)** es mucho menos frecuente, con una prevalencia de 1/40000 nacimientos <sup>31</sup>. Aproximadamente el 80% de los gliomas desarrollados son tumores de la cola de caballo o intramedulares, particularmente endimomas <sup>32</sup>.

- **HISTORÍA CLÍNICA/ ANTECEDENTES PERSONALES**

### ALERGIAS

Existen algunos estudios que han demostrado una relación inversa entre el

desarrollo de gliomas y condiciones alérgicas tales como el asma y eczema<sup>33 34</sup>  
<sup>35 36</sup>.

El riesgo disminuido de desarrollar gliomas en pacientes con alergias sugiere una influencia de los factores inmunológicos en el desarrollo de gliomas. Se ha publicado que los niveles totales de inmunoglobulina E fueron más bajos en pacientes con glioma que en los sujetos control<sup>37</sup>.

- **DAÑO CEREBRAL**

No se ha demostrado que exista una relación de causalidad entre el daño cerebral perinatal o traumático en adultos con el desarrollo de gliomas<sup>38</sup>.

- **INFECCIONES AGUDAS**

Algunos estudios epidemiológicos han demostrado que las infecciones comunes agudas en adultos disminuyen el riesgo de desarrollar gliomas, siendo las infecciones con fiebre las que aportan mayor protección<sup>39</sup>. Los sujetos que reportaron enfermedades infecciosas como resfriado o gripe demostraron una reducción del 30% en el desarrollo de tumores cerebrales<sup>33</sup>.

- **ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS<sup>40</sup>**

Se han publicado estudios que sugieren que existe una relación tanto directa como inversa entre la comorbilidad de desarrollar un cáncer y las enfermedades neurodegenerativas, que incluyen: enfermedad de Alzheimer, Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), desordenes del espectro autista, síndrome de Down, corea de Huntington, esclerosis múltiple (EM), enfermedad de Parkinson y esquizofrenia.

En un meta análisis realizado a partir de 50 estudios observacionales y con una población de 577013 pacientes se comprobó que la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas (enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, EM y corea de Huntington) se asociaban con una disminución de la aparición simultánea de cánceres en estos pacientes. Sin embargo, los pacientes con síndrome de Down tienen incidencias mayores de cáncer, y no se demostró asociación, tanto en el ELA como en la esquizofrenia.

Por lo tanto, establecer la relación de comorbilidad entre pacientes con enfermedades neurodegenerativas y cáncer continúa siendo un reto; no obstante según los datos obtenidos hasta el momento, predominan los que sugieren un “efecto anti-cáncer” en la mayoría de enfermedades neurodegenerativas mediante mecanismos no aclarados aún.

### **1.3. CLASIFICACIÓN**

La clasificación de los tumores del SNC de la Organización Mundial de la Salud (OMS) es la clasificación más común y universalmente utilizada.

En su origen esta clasificación se basaba en la morfología de las células tumorales y su parecido a las células normales cerebrales, con un sistema de gradación basado en la supervivencia de los tumores si se dejaban sin tratar.

Así la clasificación de los tumores del SNC de la OMS de 2007 agrupaba a los tumores según el fenotipo histológico fuera astrocitario o oligodendrocítico, sin tener en cuenta otros factores como la clínica y el pronóstico<sup>41</sup>.

#### **1.3.1. CLASIFICACIÓN DE LOS TUMORES DEL SNC SEGÚN LA OMS 2007**

Las neoplasias del sistema nervioso central se clasifican en primarias y metastásicas.

Las primarias se dividen en seis categorías principales (tabla 1.1).

Los más frecuentes son los “tumores del tejido neuroepitelial” seguida por los tumores de las meninges. Los tumores de los nervios craneales y espinales, los linfomas y las neoplasias hematopoyéticas y los tumores de células germinales son grupos menos frecuentes. La categoría final de neoplasias primarias se identifican por la región anatómica en lugar de por el tipo histológico.



<p><b>1. TUMORES DEL TEJIDO NEUROEPITELIAL</b>  <b>Tumores astrocitarios:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Astrocitoma de bajo grado</li> <li>- Pilocítico, protoplásmico, gomistocítico</li> <li>- Astrocitoma anaplásico</li> </ul>	<p><b>2. TUMORES DE LAS MENINGES Y TEJIDOS AFINES:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Meningioma benigno:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Meningotelial</li> <li>• Fibroso</li> <li>• Transicional</li> </ul> </li> <li>- <b>Meniingioma maligno</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hemangiopericitoma</li> </ul> </li> <li>- <b>Sarcomas meníngeos</b></li> </ul>
<p><b>Tumores oligodendrogiales:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Oligodendroglioma de bajo grado</li> <li>- Oligodendroglioma mixto</li> <li>- Oligodendroglioma anaplásico</li> </ul>	<p><b>3. LINFOMA PRIMARIO DEL SNC</b></p>
<p><b>Tumores ependimarios:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ependimoma de bajo grado</li> <li>- Ependimoma anaplásico</li> </ul>	<p><b>4. TUMORES DE CÉLULAS GERMINALES:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Germinoma</li> <li>- Carcinoma embrionario</li> <li>- Tumor del seno endodérmico</li> <li>- Coriocarcinoma</li> <li>- Teratoma: <ul style="list-style-type: none"> <li>Maduro</li> <li>Inmaduro</li> </ul> </li> </ul>
<p><b>Tumores de los plexos coroideos:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Papiloma de los plexos coroideos</li> <li>- Carcinoma de los plexos coroideos</li> </ul>	<p><b>OTROS TUMORES DE EMBRIOGÉNESIS DESORDENADA:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Craneofaringioma</li> <li>- Tumor epidermoide</li> <li>- Tumor dermoide</li> <li>- Quiste coloideo del tercer ventrículo</li> </ul>
<p><b>Tumores de las células pineales:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Pineocitoma</li> <li>- Pineoblastoma</li> </ul>	<p><b>5. TUMORES HIPOFISARIOS:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Lóbulo anterior: adenoma, carcinoma</li> <li>- Lóbulo posterior: coristoma</li> </ul>
<p><b>Tumores embrionarios poco diferenciados:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Glioblastoma</li> <li>- Meduloblastoma</li> </ul>	<p><b>EXTENSIÓN LOCAL DE TUMORES REGIONALES:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Cordoma</li> <li>- Tumor de glomus yugular</li> </ul> <p><b>6. TUMORES DE LAS CÉLULAS DE LAS VAINAS NERVIOSAS:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Schwannoma</li> <li>- Neurofibroma</li> </ul>

**TABLA 1. 1. Clasificación de los tumores del SNC según la OMS 2007 acorde al origen celular y grado histológico. Fuente <sup>41</sup>**

**TUMORES DEL TEJIDO NEUROEPITELIAL**

Esta categoría es muy amplia, y por tanto, se subdivide en varios subtipos. Los tumores neuroepiteliales están constituidos por neuronas y células gliales, que son las células derivadas de epitelio neural embrionario. Existen varios subtipos de células gliales: astrocitos, oligodendrocitos, células ependimarias y células ependimarias modificadas que forman el plexo coroideo. Cada tipo celular glial da lugar a un tipo específico de “glioma”. Entre todos los gliomas los astrocitomas son los más comunes.

Existen diversos tipos y subtipos histológicos de astrocitomas. Los más frecuentes son los astrocitomas infiltrantes difusos. En este caso, no existe una frontera clara entre el tumor y el tejido encéfalico normal.

El grado menos agresivo es el astrocitoma difuso de grado bajo (grado II de la OMS), seguido por el astrocitoma anaplásico (grado III de la OMS) y el glioblastoma (grado IV de la OMS). En general los astrocitomas son tumores con tendencia a la progresión maligna lo que conlleva una elevada morbimortalidad.

<b>GRADOS</b>	<b>CARACTERÍSTICAS</b>
<b>I</b>	<b>Lesiones con bajo potencial proliferativo, crecimiento expansivo, posibilidad de cura si resección quirúrgica completa</b>
<b>II</b>	<b>Lesiones con bajo potencial proliferativo, crecimiento infiltrativo y tendencia a la recurrencia. Algunas de estas lesiones tienden a progresar a grados mayores</b>
<b>III</b>	<b>Lesiones con evidencia histológica de malignidad, mitosis, anaplasia y capacidad infiltrativa</b>
<b>IV</b>	<b>Lesiones malignas, mitóticamente activas, tendencia a la necrosis y evolución rápida pre como postoperatoria</b>

**TABLA 1.2. Graduación de los tumores del SNC. Grados de malignidad de los tumores del SNC según la OMS 2007. Fuente <sup>41</sup>**

**1.3.2. CLASIFICACIÓN DE LA OMS 2016**

Por tanto, hasta el año 2016, las clasificaciones de los tumores cerebrales se basaban en la histología de los tumores, acorde a las similitudes microscópicas, teniendo en cuenta el diferente origen de las células y los niveles de diferenciación.

La nueva clasificación recoge las pautas aportadas por la reunión de la sociedad internacional de Neuropatología en Haarlem, Holanda <sup>42</sup>.

La actualización de 2016 contiene numerosas diferencias respecto a la clasificación de la OMS de 2007, la más importante es la incorporación de **parámetros moleculares** en la clasificación de los tumores del SNC (tabla 3).

Las otras recomendaciones principales fueron<sup>42</sup>:

- Las entidades diagnósticas deben definirse lo más estrechamente posible con el fin de optimizar la reproducibilidad inter-observador.
- El diagnóstico debe “etiquetarse” con una clasificación histológica. El grado de la OMS y la información molecular deben ir incluidos como un “diagnóstico integrado”.

TUMORES ASTROCITARIOS Y OLIGODENDROGLIOMAS DIFUSOS	ICD CODE
<b>Astrocitoma difuso, IDH mutado</b>	<b>9400/1</b>
<b>Astrocitoma gemitocístico, IDH mutado</b>	<b>9411/3</b>
<b>Astrocitoma difuso, IDH tipo salvaje</b>	<b>9400/3</b>
<b>Astrocitoma difuso, NOS</b>	<b>9400/3</b>
<b>Astrocitoma anaplásico, IDH mutado</b>	<b>9401/3</b>
<b>Glioblastoma, IDH subtipo salvaje</b>	<b>9401/3</b>
<b>Glioblastoma células gigantes</b>	<b>9441/3</b>
<b>Gliosarcoma</b>	<b>9442/3</b>
<b>Glioblastoma epiteloide</b>	<b>9440/3</b>
<b>Glioblastoma IDH mutado</b>	<b>9445/3</b>
<b>Glioblastoma, NOS</b>	<b>9440/3</b>
<b>Glioma difuso línea media, H3K27M</b>	<b>9385/3</b>
<b>Oligodendroglioma, IDH mutado y codelección 1p/19q</b>	<b>9450/3</b>
<b>Oligodendroglioma anaplásico, NOS</b>	<b>9450/3</b>
<b>Oligoastrocitoma, NOS</b>	<b>9382/3</b>
<b>Oligoastrocitoma anaplásico</b>	<b>9382/3</b>
<b>Oligoastrocitoma analítico</b>	<b>9382/3</b>
OTROS TUMORES ASTROCITARIOS	
<b>Astrocitoma pilocítico</b>	<b>9421/1</b>
<b>Astrocitoma pilomixoide</b>	<b>9425/3</b>
<b>Astrocitoma subependimario de células gigantes</b>	<b>9424/3</b>
<b>Xantoastrocitoma pleomórfico anaplásico</b>	<b>9424/3</b>
TUMORES EPENDIMARIOS	
<b>Subependimoma</b>	<b>9383/1</b>
<b>Ependimoma mixopapilar</b>	<b>9394/1</b>
<b>Ependimoma</b>	<b>9391/3</b>
<b>Ependimoma papilar</b>	<b>9393/3</b>
<b>Ependimoma de células claras</b>	<b>9391/3</b>
<b>Ependimoma tancítico</b>	<b>9391/3</b>
<b>Ependimoma, fusión RELA positiva</b>	<b>9396/3</b>
<b>Ependimoma anaplásico</b>	<b>932/3</b>

<b>OTROS GLIOMAS</b>	
Glioma coroideo del III ventrículo	9444/1
Glioma angiocéntrico	9431/1
Astroblastoma	9430/3
<b>TUMORES PLEXOS COROIDEOS</b>	
Papiloma plexos coroideos	9390/0
Papiloma atípico plexo coroideos	9390/1
Carcinoma plexos coroideos	9390/3
<b>TUMORES NEURO-GLIALES MIXTOS Y NEURONALES</b>	
Tumor neuroepitelial disembrioplástico	9413/0
Gangliocitoma	9492/0
Ganglioglioma	9595/1
Ganglioma anaplásico	9493/0
Gangliocitoma cerebelar displásico (enfermedad Lhermitte Duclos)	
Astrocitoma desmoplásico infantil y ganglioglioma	9412/1
Tumor glioneuronal papilar	9509/1
Tumor glioneuronal formador de rosetas	9509/1
Tumor glioneuronal difuso leptomeníngeo	
Neurocitoma central	9506/1
Neurocitoma extraventricular	9506/1
Liponeurocitoma cerebelar	9506/1
Paraganglioma	8693/1
<b>TUMORES DE LA REGIÓN PINEAL</b>	
Pineocitoma	9361/1
Tumor de diferenciación intermedia del parénquima pineal	9362/3
Pineoblastoma	9362/3
Tumor papilar de la región pineal	9395/3
<b>TUMORES EMBRIONARIOS</b>	
<b>Meduloblastomas genéticamente definidos</b>	
Meduloblastoma, WNT activado	9475/3*
Meduloblastoma, SHH activado y PT53 mutado	9476/3*
Meduloblastoma, SHH activado y PT53 subtipo salvaje	9471/3
<b>Meduloblastoma, no WNT/no SHH</b>	
Meduloblastoma, grupo 3	
Meduloblastoma, grupo 4	9477/3
<b>Meduloblastoma histológicamente definido</b>	
Meduloblastoma clásico	9470/3
Meduloblastoma nodular/desmoplásico	9471/3
Meduloblastoma con nodularidad extensiva	9471/3

Meduloblastoma, anaplásico, células grandes	9474/3
Meduloblastoma, NOS	9470/3
Tumor embrionario con rosetas en múltiples capas, C19MC-alterado	9478/3*
Tumor embrionario con rosetas en múltiples capas, NOS	9478/3*
Meduloepitelioma	9501/3
Neuroblastoma CNS	9500/3
Ganglioneuroblastoma CNS	9490/3
Tumor embrionario CNS, NOS	9473/3
Tumor teratoide/rabdoideo atípico	9508/3
Tumor embrionario CNS con características de rabdoide	9508/3
<b>TUMOR DE LOS NERVIOS ESPINALES Y PARAESPINALES</b>	
Schwannoma	9560/0
Schwannoma celular	9560/0
Schwannoma plexiforme	9560/0
Schwannoma melanotico	9560/1
Neurofibroma	9540/0
Neurofibroma atípico	9540/0
Neurofibroma plexiforme	9550/0
Perineuroma	9571/0
Tumor de la vaina nerviosa híbrido	
Tumor de la vaina nerviosa maligno periférico	9540/3
Epiteloide MPNST	9540/3
MPNST con diferenciación perineural	9540/3
<b>MENINGIOMAS</b>	
Meningioma	9560/1
Meningioma meningotelial	9531/0
Meningioma fibroso	9532/0
Meningioma transicional	9537/0
Meningioma psamomatoso	9533/0
Meningioma angiomatoso	9534/0
Meningioma microcistico	9530/0
Meningioma secretorio	9530/0
Meningioma linfoplasmocitario	9530/0
Meningioma metaplasico	9530/0
Meningioma coroideo	9538/1
Meningioma de células claras	9538/1
Meningioma atípico	9539/1
Meningioma papilar	9538/3
Meningioma rabdoideo	9538/3
Meningioma anaplásico (maligno)	9530/3
<b>TUMORES NO MENINGOTELIALES, MESENQUIMALES</b>	

<b>Hemangiopericitoma/Tumor fibroso solitario**</b>	
Grado 1	8815/0
Grado 2	8815/1
Grado 3	8815/3
<b>Hemangioblastoma</b>	9161/1
<b>Hemangioma</b>	9120/0
<b>Hemangiendotelioma epiteloides</b>	9133/3
<b>Angiosarcoma</b>	9120/3
<b>Sarcoma Kaposi</b>	9140/3
<b>PNET/sarcoma Ewing</b>	9364/3
<b>Lipoma</b>	8850/0
<b>Angiolipoma</b>	8861/0
<b>Hibernoma</b>	8880/0
<b>Liposarcoma</b>	8850/3
<b>Fibromatosis tipo desmoide</b>	8821/1
<b>Miofibroblastoma</b>	8825/0
<b>Tumor miofibroblástico inflamatorio</b>	8825/1
<b>Histiocitoma benigno fibroso</b>	8830/0
<b>Fibrosarcoma</b>	8810/3
<b>Sarcoma pleomórfico no diferenciado/ histiocitoma fibroso maligno</b>	8802/3
<b>Leiomioma</b>	8890/0
<b>Leiomiosarcoma</b>	8890/3
<b>Rabdomioma</b>	8900/0
<b>Rabdomiosarcoma</b>	8900/3
<b>Condroma</b>	9920/0
<b>Condrosarcoma</b>	9220/3
<b>Osteoma</b>	9180/0
<b>Osteocondroma</b>	9210/0
<b>Osteocondroma</b>	9180/3
<b>TUMORES MELANOCITICOS</b>	
<b>Melanocitosis meníngea</b>	8728/0
<b>Melanocitoma meníngeo</b>	8728/1
<b>Melanoma meníngeo</b>	8720/3
<b>Melanomatosis meníngea</b>	8728/3
<b>LINFOMAS</b>	
<b>Linfoma B difuso del SNC de células grandes</b>	9680/3
<b>Inmunodeficiencias asociadas a linfomas del SNC</b>	
<b>Linfoma B difuso del SNC de células grandes asociado al SIDA</b>	
<b>Linfoma B difuso del SNC de células grandes asociado al VEB, NOS</b>	
<b>Granulomatosis linfomatoide</b>	9766/1
<b>Linfoma B células grandes intravascular</b>	9712/3
<b>Linfoma SNC células B bajo grado</b>	

<b>Linfoma SNC células T y NK</b>	
Linfoma células grandes anaplásico, ALK positivo	9714/3
<b>Linfoma células grandes anaplásico, ALK negativo</b>	
Linfoma MALT de la dura	9699/3
<b>TUMORES HISTIOCITARIOS</b>	
Histiocitosis de células de Langerhans	9751/3
Enfermedad Erdheim-Chester	9750/1
Enfermedad Rosai-Dorfman	
Xantogranuloma juvenil	
Sarcoma histiocítico	9755/3
<b>TUMORES CÉLULAS GERMINALES</b>	
Germinoma	9064/3
Carcinoma embrionario	9070/3
Tumor del saco vitelino	9071/3
Coriocarcinoma	9100/3
Teratoma	9080/1
Teratoma maduro	9080/0
Teratoma inmaduro	9080/3
Teratoma con transformación maligna	9084/3
Tumor de células germinales mixto	9085/3
<b>TUMORES DE LA REGIÓN SELAR</b>	
Craneofaringioma	9350/1
Craneofaringioma adenomantinomatoso	9351/1
Craneofaringioma papilar	9352/1
Tumor de la región selar de células granulares	9582/0
Pituicitoma	9432/1
Oncocitoma fusocelular	8290/0
<b>TUMORES METÁSTASICOS</b>	

**TABLA 1.3. Clasificación OMS 2016. Fuente: reeditado a partir de los datos de <sup>43</sup>**

*Los códigos morfológicos son de la Clasificación Internacional de Enfermedades de Oncología (ICD-O). El comportamiento se clasifica como 0: benignos/ 1: borderline, no específico o inciertos/ 2: carcinoma in situ y neoplasias intraepiteliales grado III/ 3: tumores malignos*

### **NOMENCLATURA**

Los diagnósticos para los tumores del SNC deben incluir el nombre histopatológico seguido de las características genéticas seguido de una coma y sus adjetivos. Ejemplo: *Astrocitoma difuso, IDH mutado.*

## INTRODUCCIÓN

Cuando un tumor no tenga una mutación genética, se puede utilizar el término *tipo salvaje* como término genético oficial. *Ejemplo: glioblastoma multiforme IDH-tipo salvaje*. Sin embargo en la mayoría de las ocasiones la falta de una mutación genética se nombra como NOS (*not otherwise specified/ no especificado de otra forma*).

<b>TUMORES ASTROCITARIOS Y OLIGODENDROGLIOMAS DIFUSOS</b>		<b>Neurocitoma cerebeloso</b>	<b>II</b>
<b>TUMORES DE LA REGIÓN PINEAL</b>			
Astrocitoma difuso, IDH mutado	II	Pineocitoma	I
Astrocitoma anaplásico IDH mutado	III		
Glioblastoma, IDH subtipo salvaje	IV	Tumor de la región pineal de diferenciación intermedia	II o III
Glioblastoma IDH mutado	IV	Pineoblastoma	IV
Glioma difuso línea media, IDH mutado y codeleción 1p/19q	IV	Tumor papilar de la región pineal	
Oligodendroglioma, IDH mutado codeleción 1p/19q	II	<b>TUMORES EMBRIONARIOS</b>	
Oligodendroglioma anaplásico IDH mutado codeleción 1p/19q	III	Meduloblastoma (todos los subtipos)	IV
<b>OTROS TUMORES ASTROCITARIOS</b>		Tumor embrionario con rosetas en múltiples capas	IV
Subependioma	I	Meduloepitelioma	IV
Ependimoma mixopapilar	I	Tumor embrionario SNC, NOS	IV
Ependimoma	II	Tumor rabdoide/teratoide atípico	IV
Ependimoma, RELA fusión-positivo	II/ III	Tumor embrionario SNC con características rabdoideas	IV
Ependimoma anaplásico	III	<b>TUMORES NERVIOS CRANEALES Y PARAESPINALES</b>	
<b>OTROS GLIOMAS</b>		Schwannoma	I
Glioma angiocéntrico	I	Neurocitoma extraventricular	II
Glioma coroideo del tercer ventrículo	II	Neurofibroma	I
<b>TUMORES PLEXO COROIDEO</b>		Perineuroma	I
Papiloma plexo coroideo	I	Tumor de la vaina nerviosa maligno	II, III o IV
Papiloma atípico del plexo coroideo	II	<b>MENINGIOMAS</b>	
Carcinoma plexo coroideo	III	Meningioma	I
<b>TUMORES NEURONALES Y MIXTOS DE CÉLULAS GLIALES</b>		Meningioma atípico	II



<b>Tumor disembrioplasico</b>	<b>neuroepitelial</b>	I	Meningioma (maligno)	anaplásico	III
<b>Gangliocitoma</b>		I	<b>TUMORES NO MENINGOTELIALES, MESENQUIMATOSOS</b>		
<b>Ganglioglioma</b>		I	Tumor solitario/hemangiopericitoma	fibroso	I, II, III
<b>Ganglioglioma anaplásico</b>		III	<b>TUMORES DE LA REGIÓN SELAR</b>		
<b>Gangliocitoma displasico del cerebelo (Lhermitte-Duclos)</b>		I	Craniofaringioma		I, II, III
<b>Ganglioglioma y desmoplásico infantil</b>	<b>astrocitoma</b>	I	Tumor de las células granulares		I
<b>Tumor glioneuronal formador de rotetas</b>		I	Pituicitoma		I
<b>Neurocitoma central</b>		II	Oncocitoma fusocelular		I

**TABLA 1.4. Gradación de los tumores del SNC acorde a la clasificación de la OMS de 2016. Fuente <sup>43</sup>**

### **1.3.3 PRINCIPALES CAMBIOS DE LA CLASIFICACIÓN OMS TUMORES SNC DE 2016 RESPECTO A LA DE 2007 <sup>43</sup>**

1. Se han añadido una gran cantidad de entidades y variantes nuevas.

2. Gliomas difusos.

En la clasificación actual todos los gliomas infiltrativos se clasifican juntos, tanto astrocitos y oligodendrocitos, a diferencia de la clasificación de 2007.

En esta nueva clasificación, los gliomas difusos incluyen los grado II y III astrocitarios, grado II y III oligodendrogliomas, grado IV glioblastomas, así como a los gliomas difusos de la infancia de la clasificación previa.

Este nuevo grupo de gliomas difusos comparten la mutación genética de los genes IDH 1 e IDH 2, así como patrones de crecimiento y comportamiento similares.

Este grupo comparten marcadores pronósticos similares que pueden ser utilizados para guiar el uso de terapias (convencionales o diana) para entidades genéticamente y biológicamente similares.

**3. Astrocitoma difuso y astrocitoma anaplásico**

Los astrocitoma difuso grado II y astrocitoma anaplásico grado III son divididos en IDH-mutado, IDH-tipo salvaje y categorías NOS.

Los astrocitomas difusos subtipo IDH y subtipo salvaje son diagnósticos poco comunes, por tanto, se tiene que valorar con cautela el diagnóstico ya que en realidad podría tratarse de lesiones de menor grado como los gangliogliomas.

Finalmente si en el caso de un astrocitoma difuso o anaplásico el test de IDH no está disponible, el diagnóstico sería se astrocitoma difuso, NOS o astrocitoma anaplásico NOS, respectivamente.

#### 4. Glioblastomas.

En la clasificación de la OMS 2016 los glioblastomas se dividen en:

- **Glioblastomas, IDH tipo salvaje** (alrededor del 90% de los casos). Corresponden con los definidos previamente como de novo o primarios, más frecuente en pacientes por encima de 55 años <sup>44</sup>.
- **Glioblastoma, IDH mutado** (10% de los casos) que se corresponden con los llamados glioblastomas secundarios que son aquellos que derivan de gliomas difusos de menor grado y preferiblemente aparecen en pacientes más jóvenes.
- **Glioblastoma, NOS**. Se reserva para aquellos pacientes en los que no se puede realizar el test de IDH.
- **Glioblastoma epiteloide**. Es un nuevo subtipo de glioblastoma que se ha añadido a la clasificación. Se une a los diagnósticos de glioblastoma de células gigantes y el gliosarcoma para incluirse como subtipos del glioblastoma, IDH tipo salvaje.
- Glioblastoma con componente neuronal primitivo era un subtipo de glioblastoma. Este tumor previamente referido en la literatura como glioblastoma PTNET-like se puede corresponder con un astrocitoma difuso de cualquier grado (raramente oligodendrogliomas). Estos tumores tienen tendencia a la diseminación por el LCR <sup>45</sup>.

	<b>GLIOBLASTOMA IDH TIPO SALVAJE</b>	<b>GLIOBLASTOMA IDH MUTADO</b>
<b>Sinónimo</b>	Glioblastoma primario, IDH-tipo salvaje	Glioblastoma secundario, IDH mutado
<b>Lesión precursora</b>	No identificada, se desarrolla de novo	Astrocitoma difuso, astrocitoma anaplásico
<b>Proporción</b>	90%	10%
<b>Media de edad al diagnóstico</b>	62 años	44 años
<b>Ratio hombre/mujer</b>	1.42/1	1.05/1

Media duración historia clínica	4 meses	15 meses
Mediana de supervivencia global Cirugía + radioterapia	9,9 meses	24 meses
Cirugía+ radioterapia+ quimioterapia	15 meses	31 meses
Localización	Supratentorial	Preferentemente frontal
Necrosis	Extensa	Limitada
Mutación promotores TERT	72%	26%
Mutación TP53	27%	81%
Mutación ATRX	Excepcional	71%
Amplificación EGFR	35%	Excepcional
Mutación PTEN	24%	Excepcional

**TABLA 1.5. Características de los glioblastomas IDH subtipo salvaje vs glioblastomas IDH mutado: comparación de factores clínicos y genéticos. Fuente: reeditada por <sup>43</sup>, a partir de datos de <sup>1, 44</sup>**

### **CLASIFICACION**

Los glioblastomas se dividen en primarios y secundarios.

- **Primario (De novo).** Estos tumores son más agresivos que los secundarios y son más frecuentes en pacientes más mayores (media de edad: 62 años). Suelen tener alteraciones genéticas, como son la amplificación del gen EGFR (codifica el receptor del factor de crecimiento epitelial) y sobreexpresión del oncogen MDM2 (que reprime a la p53 <sup>46</sup>), la mutación del gen PTEN, que codifica una proteína supresora de tumores (hasta en el 40% de los casos) y/o la pérdida de la heterocigosidad del cromosoma 10p, lo que indican una alta tasa proliferativa e inestabilidad genómica <sup>8, 47</sup>.
- **Secundario**  
 Los glioblastomas secundarios son aquellos que crecen a partir de gliomas de grado inferior preexistentes (generalmente 4-5 años de progresión). La edad de media de estos pacientes es 45 años.  
 Estos tumores tienden a ser menos agresivos que los primarios.  
 Característicamente, y a diferencia de los primarios, los glioblastomas secundarios suelen ser IDH1 positivos (se asocia esta mutación a una mayor supervivencia), presentan la mutación del p53 <sup>46</sup> (gen que codifica la principal proteína supresora de tumores), la amplificación del PDGF-R, la pérdida de la heterocigosidad del cromosoma 10p y 17p, la pérdida del 19q y un incremento

en la actividad de la telomerasa y la expresión del hTERT (gen que codifica la enzima telomerasa inversa y repara los daños en los telómeros)<sup>12, 13, 14</sup>.

De todas estas, la mutación del IDH1 es la que más nos permite distinguir entre glioblastomas primarios y secundarios, ya que está presente en más del 80% de los astrocitomas grado II y III<sup>47</sup>.

5. **Oligodendrogliomas.** El diagnóstico de oligodendroglioma y oligodendroglioma anaplásico requiere la demostración de la mutación IDH como la delección 1p/19q.

En caso de no poder realizar las pruebas genéticas se refieren como oligodendroglioma, NOS.

En el caso de tener un oligodendroglioma sin diagnóstico genético hay que realizar una evaluación cuidadosa para descartar glioblastoma<sup>48</sup>.

6. **Oligoastrocitomas.**

Los diagnósticos de oligoastrocitoma grado II y oligoastrocitoma anaplásico grado III contemplados en la clasificación anterior se refieren ahora como subtipo NOS, lo que indica que sólo se puede realizar este diagnóstico en el caso de que no se puedan realizar las pruebas moleculares adecuadas<sup>49, 50</sup>.

Particularmente, existen casos de verdaderos oligoastrocitomas en la literatura, con fenotipo y genotipo tanto de componentes de oligodendroglioma como de astrocitoma en el mismo tumor. Sin embargo hasta que no existan pruebas que permitan confirmarlos según la nueva clasificación de 2016, se refieren provisionalmente bajo los subtipos oligoastrocitoma, NOS y oligoastrocitoma anaplásico, NOS.

7. **Gliomas difusos pediátricos.**

Existe un grupo de tumores que ocurren primariamente en los niños (a veces también en adultos) que se caracterizan por<sup>51, 52, 53</sup>:

- mutación de la histona 3 en el gen H3F3A, o menos frecuentemente en el gen HIST1H3B.
- crecimiento difuso.
- localización en la línea media (tálamo, tronco-encéfalo y médula espinal...).

Esta nueva entidad se define como glioma difuso de línea media, H3 K27M-mutado e incluye a los referidos previamente como gliomas difusos intrínsecos pontinos.

Se espera que esta nueva clasificación, más objetiva y precisa en la diferenciación de entidades, sirva para mejorar la terapia de cada paciente.

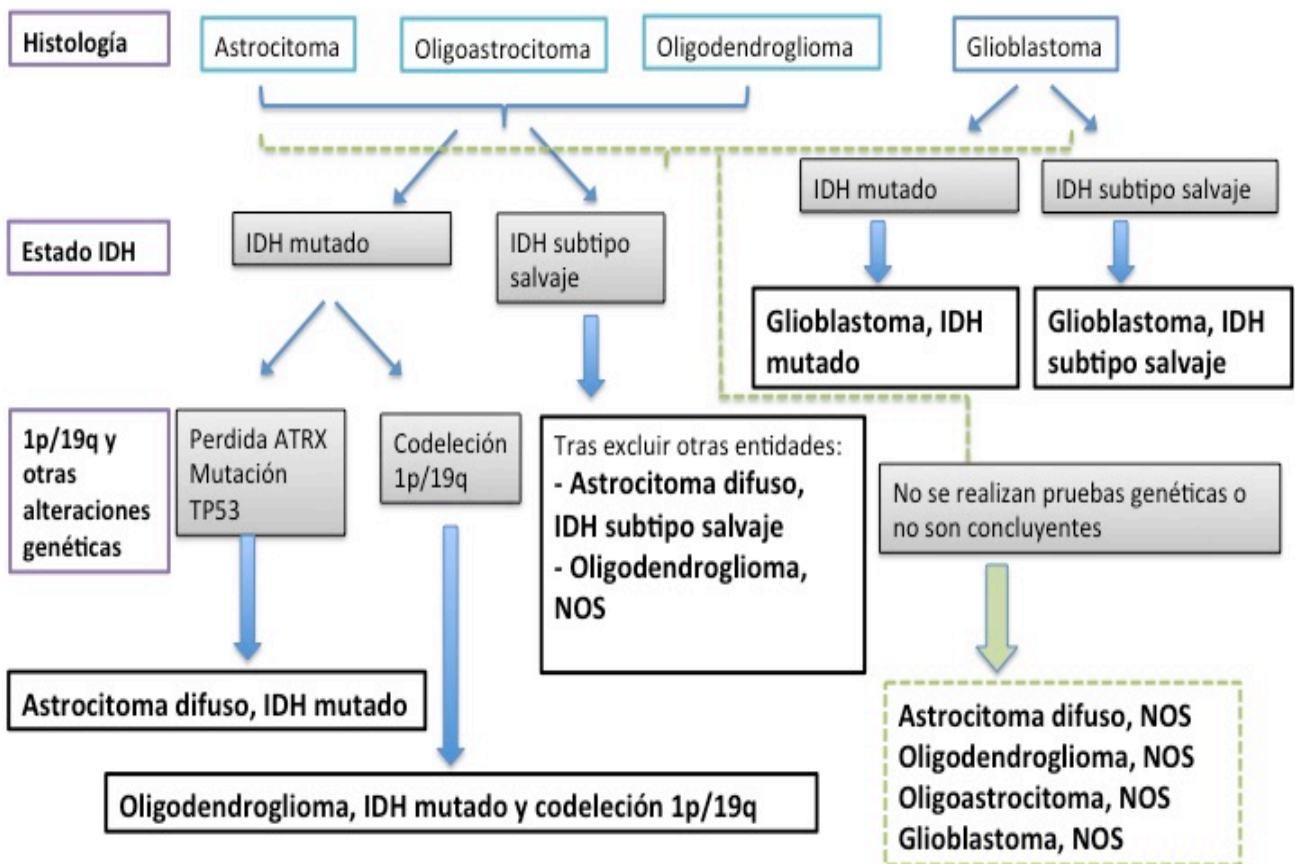


FIGURA 1.3. Un algoritmo simplificado de la clasificación de los gliomas difusos basado en las características histológicas y genéticas, fuente <sup>43</sup>.

**¿Qué genes se deberían evaluar de rutina?**

La clasificación de la OMS de 2016 destaca las mutaciones IDH y la codeleción 1p/19q, no obstante existen otras mutaciones genéticas que se pueden observar en los gliomas y si bien no son necesarias para la clasificación de la OMS de 2016 podrían ayudar a comprender mejor el diagnóstico molecular <sup>54</sup>.

- **MUTACIONES IDH**

La evaluación de la mutación de IDH hoy en día forma parte del diagnóstico estándar.

En los gliomas se aprecia la mutación de los genes IDH1 e IDH2. Todas las mutaciones de IDH1 e IDH2 son somáticas, heterocigóticas y afectan al codón 132 (IDH1) o al codón 172 (IDH2). El 90% son mutaciones que afectan al R132H IDH1 <sup>55</sup>.

Las mutaciones IDH son comunes en gliomas II y III de adultos, afectan al 70-80% de los caso <sup>56</sup>. Sobre el 5-10% de los glioblastomas muestran mutaciones en IDH y particularmente los pacientes menores de 50 años. Los pacientes con

IDH mutado tienen mejor pronóstico comparado con los que IDH-no mutados de similar grado histopatológico<sup>57</sup>.

Algunos estudios sugieren que la mutación de IDH se puede utilizar para identificar pacientes que se beneficiarían de añadir quimioterapia a la radioterapia. Sin embargo otros estudios sugieren que la metilación del promotor MGMT es mejor factor predictivo a la respuesta al tratamiento, el cual suele estar presente en los tumores IDH mutado<sup>58, 59, 60</sup>.

- **CODELECCIÓN 1p/19q**

La deleción de 1p/19q fue identificada por primera vez en 1994 como la lesión genética más característica en el oligodendroglioma, asociado a la respuesta a QMT en 1998<sup>61</sup>. Por tanto se considera un factor de buen pronóstico y supervivencia, ya que existen beneficios de añadir la quimioterapia de procarbina/lomustina/ vincristina a la radioterapia<sup>62, 63</sup>.

Muchos estudios recientes sugieren que la pérdida de 1p/19q está siempre asociado con las mutaciones de IDH<sup>64, 65</sup>.

- **PROTEINA 53 TUMORAL**

P53T son mutaciones observadas en los exones 4-8 y ocurren en el 95% de los tumores IDH mutados sin la deleción 1p/19q. Ocurren también en otros tumores gliales como los glioblastomas, meduloblastomas, tumores con deleción 1p/19q y gliomas pediátricos. No se relacionan con mejoría en el tratamiento<sup>54</sup>.

- **GEN SÍNDROME DE ALFA-TALASEMIA**

El gen del síndrome X ligado a retraso mental/alfa-talasemia (ATRX) ocurre en el 70% de los gliomas IDH mutados sin la codeleción 1p/19q, tumor glial tipo astrocitario.

- **MUTACIONES EN EL PROMOTOR DE LA ENZIMA TELOMERASA TRANSCRIPTASA INVERSA (TERT).**

La mutación somática en TERTp ocurre en pacientes con glioblastoma IDH subtipo salvaje y en oligodendrogliomas con la codeleción 1p/19q. Por tanto, las mutaciones tanto en TERTp como en el IDH son armas potentes para la clasificación pronóstica del glioblastoma multiforme<sup>66, 67</sup>

Son pacientes con mal pronóstico los que presenta sólo mutación de TERTp sin otras alteraciones típicas de gliomas.

La mutación de TERTp puede ser útil para diagnosticar glioma IDH subtipo salvaje, sin embargo no son mutaciones específicas de gliomas y se pueden ver en otros tumores, por ejemplo meduloblastoma.

- **GENOTIPO DE GANANCIA EN CROMOSOMA 7 Y PÉRDIDA DE 10q.**

La combinación de la tri/polisomía del cromosoma 7 y pérdida de 10q es una combinación característica encontrada en muchos glioblastomas y probablemente representa un evento temprano en estos tumores<sup>68,69</sup>.

Muchos astrocitomas IDH subtipo salvaje y astrocitomas anaplásicos (especialmente mayores de 45 años) muestran este tipo 7+/10q- y típicamente tienen un curso más agresivo.

Realizar este test en pacientes por encima de 45/50 años con tumores IDH subtipo salvaje II o III nos puede indicar un pronóstico pobre si el resultado es positivo.

La clasificación de la OMS sugiere que el diagnóstico de glioblastoma debe ser considerado en oligodendrogliomas y oliogastrocitomas anaplásicos 7+/10q- aunque todavía no se incluyen como tal en la clasificación actual <sup>51</sup>.

- **AMPLIFICACIÓN DEL GEN EGFR**

La amplificación del gen EGFR promueve el crecimiento celular, la migración y la supervivencia celular. Se encuentra en el 40% de los GB (predominantemente en los IDH1) y es más frecuente en adultos. La mitad de los casos de amplificación de EGFR contienen una variante truncada del gen que codifica una proteína que carece de dominio extracelular y que se mantiene constitutivamente activa (EGFRvIII). La amplificación EGFR es mutuamente excluyente de mutación TP53. No existe consenso sobre el valor pronóstico de la amplificación de este gen <sup>70, 71</sup>.

Existen otras alteraciones genéticas implicadas en los gliomas, pero actualmente no se consideran que tengan implicación pronóstica tales como mutaciones de PTEN, mutaciones en genes BRAF y mutaciones en Histona H3F3A y HIST1H3B.

### 1.4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La clínica de los tumores cerebrales depende fundamentalmente de su localización anatómica.

Los signos/síntomas son frecuentes, de aparición y progresión rápida, con una historia corta de duración que suele ser menor de tres meses.

Se pueden dividir en dos tipos: los relacionados con el aumento de la presión intracraneal y los síntomas focales específicos de la localización.

Los síntomas de **hipertensión intracraneal** son los siguientes:

- Cefalea: es el síntoma más frecuente. Se caracteriza por ser opresiva, difusa y aumentar con las maniobras de Valsalva.
- Edema de papila y alteraciones visuales
- Náuseas y vómitos
- Trastornos del comportamiento
- Hernias cerebrales. Son la forma más grave de hipertensión intracraneal. Existen cuatro tipos de hernias cerebrales:
  - Hernia subfalcina (HSF). La circunvolución del cíngulo se desplaza bajo la hoz del cerebro. El ventrículo ipsilateral queda comprimido y desplaza la línea media.
  - Hernia transtentorial descendente (HTD) bilateral o hernia central. Ambos lóbulos temporales se hernian hacia el hiato tentorial.
  - Hernia transtentorial descendente (HTD) unilateral o uncal. El uncus del lóbulo temporal se desplaza hacia el hiato tentorial y desplaza los pedúnculos.
  - Hernia amigdalina. Se asocian con masas de la fosa posterior. Las amígdalas cerebelosas descienden y quedan impactadas en el agujero magno.

**Síndromes focales.** Las lesiones ocupantes de espacio producen síntomas específicos según la localización sobre la que asienten.

- Tumores del lóbulo frontal.
  - Región prefrontal: irritabilidad, depresión, incontinencia de esfínteres.
  - Región precentral: crisis parciales motoras contralaterales, déficit motor progresivo.
  - Región frontobasal: trastornos psíquicos, crisis parciales complejas con automatismos, afasia motora en el hemisferio dominante.
  - Tumores del lóbulo parietal.
  - Región parietal posterior: en el hemisferio dominante acalculia, agrafia, alexia y agnosia digital (síndrome de Gerstmann).
  - Región postrolándica: crisis sensitivas y sensitivas motoras, estereognosia.
- Tumores del lóbulo temporal.



## INTRODUCCIÓN

- Región lateral: Crisis parciales sensoriales con alucinaciones auditivas y vertiginosas, afasia de Wernicke en el hemisferio dominante.
- Región medial: crisis uncinadas, crisis parciales complejas con automatismos, cuantantapnosia homónima superior.
- Tumores del lóbulo occipital: hemianopsia homónima, cuantantapnosia homónima superior o inferior, agnosia visual, crisis visuales, micropsias, macropsias, metamorfosis, síndrome de Balint, síndrome de Anton-Babinski.
- Tumores de los ventrículos laterales: hipertensión intracraneal intermitente o crónica.

### 1.5. DIAGNÓSTICO

#### 1.5.1. DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO

##### **Características macroscópicas anatomopatológicas y quirúrgicas <sup>72</sup>:**

Los glioblastomas son típicamente masas necróticas de bordes mal definidos con infiltración difusa. La localización más frecuente es la sustancia blanca supratentorial.

Estos tumores pueden ser firmes o gelatinosos. La variación regional del tejido intratumoral es característica. Algunas áreas son firmes y blancas, otras son suaves y amarillas (secundarios a la necrosis), y otras son quísticas con hemorragia local.

Existe una gran variabilidad en el tamaño de las lesiones, desde unos pocos centímetros a otras que reemplazan todo un hemisferio.

La infiltración más allá del margen de tumor visible está siempre presente.

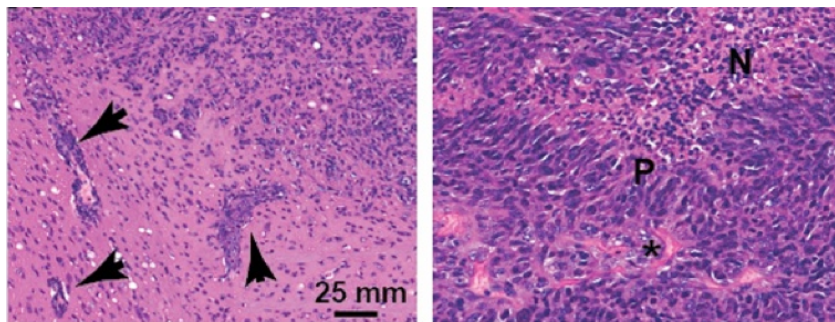
##### **Apariencia microscópica**

Son características la necrosis y la proliferación microvascular, sobretodo en los márgenes del tumor. La proliferación microvascular suele aparecer como agrupaciones de vasos de aspecto tortuoso (pseudoglomeruloide) en los márgenes infiltrativos del tumor.

Citológicamente, son frecuentes los astrocitos pleomórficos con atipia nuclear marcada y numerosas mitosis.

Variantes:

- Glioblastoma de células gigantes: 5% de los glioblastomas, variante histológica que presenta una leve mejoría en el pronóstico.
- Gliosarcoma, formado por células pequeñas.



**FIGURA 1.4.** Imagen histológica de glioblastoma multiforme. Se observa la proliferación de células vasculares (flechas) y la gran vascularización (\*), con células formando pseudoempalizadas (P) y con abundantes focos necróticos (N).  
Figura de fuente: NIH-National Cancer Center.

##### **Inmunohistoquímica**

Son GFAP (proteína glial fibrilar ácida) positivos.

IDH1 es positivo en GBM secundarios, como hemos descrito antes.

### **1.5.2 DIAGNÓSTICO RADIOLÓGICO**

Los GBM son típicamente tumores grandes al diagnóstico.

Normalmente se presentan como una lesión de márgenes mal definidos y centro necrótico, que tras la administración de contraste muestran un realce de su pared. Esto se asocia a edema vasogénico perilesional que suele estar infiltrado por células neoplásicas<sup>72</sup>.

#### **1.5.2.1. TC**

TC sin contraste: masa irregular isodensa o hipodensa con hipodensidad central en relación con necrosis. Asocia un efecto de masa marcado y edema/infiltración tumoral adyacente.

La administración de contraste aparte de caracterizar mejor el tumor, nos permite realizar el diagnóstico diferencial con otros tumores, lesiones infecciosas y/o patología cerebrovascular.

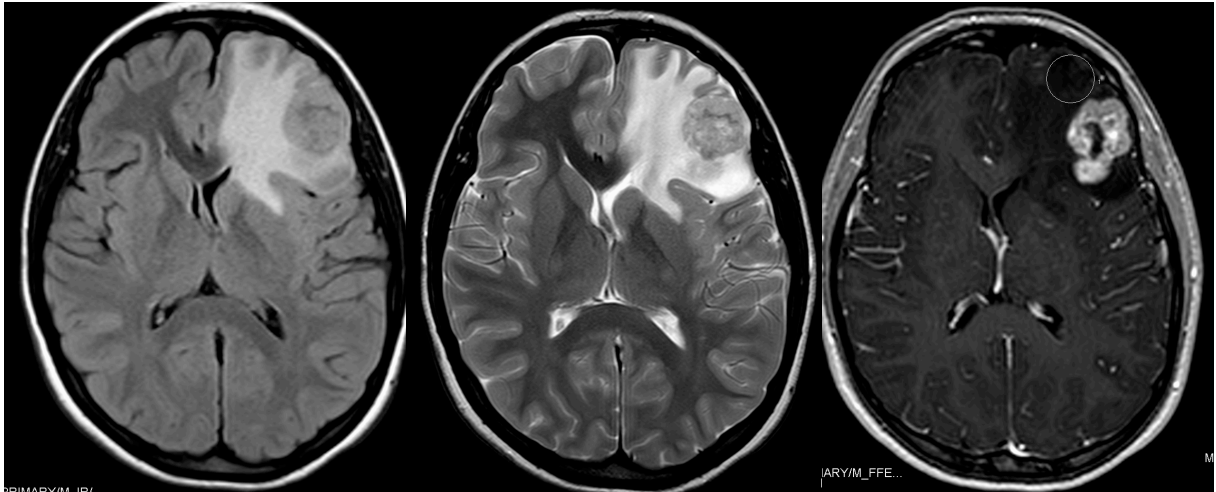
Esta técnica además, permite saber si hay presencia de calcificaciones en el tumor, hemorragias agudas y cambios óseos relacionados con el tumor. Estos datos son indicativos del tipo de crecimiento tumoral y por lo tanto del grado de malignidad del mismo.

#### **1.5.2.2. RM**

La RM se considera la técnica de elección para el estudio de imagen.

##### **1.5.2.2.1. TÉCNICAS DE RM CONVENCIONAL:**

- Potenciación en T1. Masa hipo a isointensa dentro de la sustancia blanca. Señal heterogénea central (por hemorragia o necrosis)
- T2/FLAIR. El tumor suele presentar una señal heterogénea, rodeado de hiperseñal T2 atribuible a edema vasogénico.
- T1 con contraste (Gadolinio i.v). El realce es variable pero siempre está presente. Típicamente es periférico e irregular.
- T2\* eco gradiente. Artefacto por susceptibilidad relacionado con productos hematológicos.



**FIGURA 1.5.** Ejemplo de glioblastoma multiforme frontal izquierdo en secuencias axial T1, T2 y T1 con contraste iv (de izquierda a derecha).

### 1.5.2.2.2. TÉCNICAS DE RM AVANZADA <sup>73</sup>:

#### 1.5.2.2.2.1. DIFUSIÓN

Existe una relación entre la densidad celular y la difusión del agua, de forma que los tumores muy celulares producen una restricción de su difusión.

La imagen potenciada en difusión (DWI) ayuda a valorar las características del tumor según el movimiento molecular (movimiento Browniano) de los protones de agua entre el tejido normal y el tumoral. Para ello se aplican unos gradientes al campo magnético. A mayor gradiente (mayor «factor b»), más potenciación en difusión. A partir de múltiples factores b (en cerebro habitualmente  $b=0$  y  $b=1.000$ ) se pueden obtener mapas cuantitativos de difusión aparente (ADC) que nos permiten calcular el movimiento de difusión aparente de los protones de agua (en  $\text{mm}^2/\text{s}$ ). Los valores de ADC son inversamente proporcionales a la densidad celular, atribuible a la tortuosidad del espacio intersticial y a la limitación del movimiento de los protones de agua <sup>73</sup>.

Los gliomas de alto grado han demostrado tener menor valores de ADC que los de bajo grado, no obstante los mapas de ADC por sí solos no pueden determinar el tipo y grado de neoplasia glial <sup>74</sup>.

#### 1.5.2.2.2.2. TENSOR DE LA DIFUSIÓN <sup>75</sup>

Mediante la secuencia de difusión convencional se valora exclusivamente si el agua libre se puede mover más o menos. Sin embargo, si se aplican los gradientes en distintas direcciones podemos detectar si se mueve más fácilmente en una dirección que en otra. A esta difusión asimétrica, facilitada en una dirección concreta, se le denomina anisotropía. Así, en la sustancia blanca la difusión de las moléculas de agua libre no es la misma en todas las direcciones, ya que la difusión

está facilitada siguiendo la orientación de los axones. En este contexto, la difusión de las moléculas de agua en un volumen no formará una esfera, sino una elipse. Matemáticamente, las elipses se representan por un tensor. Para cuantificar los valores vectoriales del tensor utilizamos la difusibilidad media como medida de difusión isotrópica (es decir, si globalmente se mueven las moléculas mucho o poco) y la fracción de anisotropía (FA) como medida de difusión anisotrópica (es decir, si se mueven más fácilmente en una dirección que en otra) <sup>76</sup>.

El análisis de la información de cada vóxel se denomina imagen del tensor de la difusión (DTI) o RM basada en el tensor de la difusión.

La medición del ADC a lo largo de múltiples orientaciones proporciona una importante información de la organización axonal del cerebro. Todas las máquinas de RM están equipadas con tres gradientes ortogonales llamados X, Y y Z, combinando estos tres gradientes puede calcularse cualquier eje arbitrario.

Cálculo del tensor de la difusión. El parámetro empleado en nuestro proyecto es la fracción de anisotropía (FA), aunque existen otros. La FA es una medida de la anisotropía de la difusión que representa la proporción de la magnitud de la parte anisotrópica del tensor de la difusión y la magnitud del tensor completo.

La FA es una variable numérica cuyos valores oscilan entre 0 (máxima isotropía, tal como la observada en espacios subaracnoideos y ventrículos normales, donde el agua se moviliza libremente) y 1 (máxima anisotropía por restricción en el movimiento del agua tisular).

Por tanto, el índice cuantitativo de difusión anisotrópica (FA) se correlaciona con la integridad microestructural de los tractos de mielina.

### **1.5.2.2.3. PERFUSIÓN**

El objetivo de los estudios de perfusión por RM es determinar el grado de vascularización de un tumor, como indicador indirecto de la angiogénesis y en consecuencia del grado tumoral <sup>76</sup>.

Existen múltiples técnicas de perfusión, pero la más frecuentemente empleada es el estudio dinámico del efecto de susceptibilidad del contraste con secuencias potenciadas en T2\* <sup>77</sup>. Consiste en el análisis dinámico (con mediciones repetidas muy rápidas) del primer paso de un bolo de contraste por un tejido. Aunque el contraste aumenta la señal en secuencias potenciadas en T1 en determinadas situaciones, también disminuye la señal en secuencias potenciadas en T2\*. De esta forma la llegada del contraste provocará un descenso de la señal de los tejidos proporcional a su componente de vasos. Una vez pasa el contraste se recupera la señal original de manera casi completa. El área de la curva de descenso de señal es proporcional al volumen de sangre cerebral (VSC) en ese tejido. Esta técnica no da valores absolutos, sino que los valores de la lesión deben compararse con los de la sustancia blanca sana, por lo que el valor obtenido es relativo (VSCr).

Para obtener la rapidez de adquisición necesaria se sacrifica resolución espacial. Por los valores elevados de vasos y sustancia gris su utilidad es menor en la valoración de lesiones pequeñas y corticales. También puede ser menos valorable donde la señal T2\* está alterada por heterogeneidad del campo (hueso, sangre, metal...) o exista extravasación del contraste, existiendo métodos para corregir estos defectos<sup>77</sup>.

Los GBM muestran valores elevados de flujo sanguíneo comparado con los tumores de bajo grado y el parénquima normal.

El volumen sanguíneo cerebral (VSC) se refiere a la cantidad de sangre en una región del cerebro en un momento determinado, habitualmente medido en ml/100 gramos de tejido. Nos da información sobre la red vascular.

Para establecer los valores de volumen, flujo y tránsito medio tiene que asumirse que el comportamiento es puramente vascular. La presencia del contraste induce una variación de señal, variación que es proporcional a la cantidad de sangre en un vóxel, y ésta al lecho vascular. Se establece una curva de intensidad señal-tiempo, de la cual puede obtenerse un mapa de volumen (VSC) a través de la conversión a curvas de concentración-tiempo (VSC se relaciona con el área bajo su curva) y además, con una curva de función de entrada arterial, también se pueden obtener los mapas de flujo y tiempo de tránsito medio (FSC y TTM). En la recirculación, las curvas de intensidad señal-tiempo muestran una nueva caída de la señal después del primer paso. Este fenómeno depende del flujo, la presión de perfusión y la tortuosidad vascular.

**Perfusión en la patología tumoral.** En el tejido tumoral, la angiogénesis produce vasos alterados, excesivos, con morfología anormal y con una elevada permeabilidad a moléculas medias/grandes.

Numerosos estudios han establecido una relación entre el grado tumoral y el VSC, de forma que a mayor grado, mayor VSC<sup>78, 79, 80</sup>. En un estudio se sugirió un valor de 1,75 de VSCr como punto de corte para distinguir gliomas de bajo grado frente a gliomas de alto grado<sup>78</sup>.

#### **1.5.2.2.4. ESPECTROSCOPIA**

Las características típicas del GBM incluyen incremento de los metabolitos de colina (CHO), lactato (lac) y lípidos (lip), así como disminución del n-acetil-aspartato (NAA) y del mioinositol (Mio)<sup>73</sup>.

La espectroscopía por RM es una técnica que permite analizar in vivo los principales metabolitos de un tejido. En este caso se obtiene una gráfica en la que

la posición del pico indica a qué metabolito representa, y la altura y en especial el área del pico indican su concentración. Según a que molécula estén unidos los hidrógenos, presentarán un distinto desplazamiento químico y por tanto una posición concreta en el espectro, definida en partes por millón (ppm)<sup>81</sup>. Hay secuencias de vóxel único (analizan un único volumen de tejido) y de vóxel múltiple (analizan múltiples vóxeles contiguos simultáneamente, obteniendo el espectro de cada vóxel y permitiendo generar mapas de concentración de metabolitos).

Para obtener un espectro adecuado es necesario suprimir la señal del agua. También es necesario asegurar una aceptable relación señal/ruido (aumenta con la  $\sqrt{n}$  de adquisiciones), por lo que los volúmenes mínimos de adquisición son de  $1 \text{ cm}^3$  que se utilizan en secuencias multivoxel. El área del vóxel suele ser de  $8 \text{ cm}^3$  en secuencias de vóxel único ( $2 \times 2 \times 2 \text{ cm}$ ).

Existen distintos parámetros que influyen en el espectro. Uno fundamental es el tiempo de eco (TE): el tiempo que pasa en milisegundos desde que aplicamos el pulso de radiofrecuencia hasta que analizamos la señal. Con TE cortos (30 ms) detectaremos más metabolitos, pero con picos peor definidos, más solapados y con una línea de base más irregular. Por el contrario, con TE intermedio/largo (a partir de 135 ms) detectaremos menos picos (sólo los principales), pero mejor definidos, favoreciendo su análisis e interpretación<sup>76</sup>.

La técnica de multivóxel muestra la distribución espacial del espectro, lo cual es útil para estudiar con detalle los tumores.

- **Colina, CHO (3.2 ppm)**. La señal de colina es suma de tres señales, procedentes de glicerofosfocolina, fosfocolina y colina libre. Los niveles de colina se relacionan con la celularidad del tumor. Aumenta con la síntesis de membrana y la proliferación celular y disminuye con la respuesta al tratamiento. Es algo mayor en sustancia blanca que en sustancia gris, con valores similares a la creatina (CR).
- **N-acetil-aspartato, NAA (2.02 ppm)**. Es un marcador de viabilidad neuronal. La disminución del NAA se debe tanto al desplazamiento de tejido por el tumor como por la destrucción neuronal que acompaña la infiltración neoplásica. En condiciones normales es el pico dominante, aproximadamente dos veces el valor de la CR. La presencia de NAA en el interior del tumor se debe a la presencia de tejido cerebral normal. No está presente en tejidos sin neuronas, como pueden ser las metástasis o los meningiomas (aunque pueden presentar pequeños picos por «contaminación» de tejido sano adyacente).
- **Creatina, CR (3.0 ppm)**. La señal esta compuesta por creatina y fosfocreatina. Es el valor más estable, por lo que se toma como metabolito de referencia.
- **Lactato, Lac (1.33 ppm)**. Se incrementa cuando hay alteración en el metabolismo de la glucosa.
- **Lípidos móviles, Lip (0.9 - 1.3 ppm)**. Las secuencias con TE corto son más sensibles para detectarlos. Su incremento se relaciona con necrosis.

## INTRODUCCIÓN

Los lípidos y el lactato no están presentes en condiciones normales y sólo aparecen con la destrucción celular y la isquemia, en general indicando una mayor agresividad.

- **Mioinositol, Mio (3.56 ppm).** Los tumores de alto grado expresan menor Mio.



### **1.6. FACTORES PRONÓSTICOS**

Se define como factor pronóstico toda medida obtenida del paciente a lo largo del tiempo, que tiene correlación con la probabilidad de recuperación o la probabilidad de recurrencia y por lo tanto con la supervivencia del paciente.

Los factores pronósticos se dividen en cuatro categorías:

- Factores anatómo-patológicos
- Factores clínicos en relación con el paciente
- Factores terapéuticos que hacen referencia al tratamiento
- Factores moleculares que hacen referencia a alteraciones moleculares propias de los gliomas.

Varios análisis multivariante han identificado variables clínicas, del tumor y del tratamiento que son factores pronósticos significativos en la supervivencia global de pacientes con tumores gliales de alto grado. La edad, el estado mental, la histología y el grado tumoral, así como la extensión de la cirugía se encuentran entre los factores pronósticos más influyentes<sup>82</sup>.

#### **1.6.1. FACTORES ANATOMO-PATOLÓGICOS**

Antes de iniciar el tratamiento en una lesión intracraneal es recomendable realizar un estudio histológico. Lo ideal es obtener una muestra de tejido tumoral, sin embargo a veces no es posible por la necesidad de una trepanación, por lo que se utilizan alternativamente técnicas poco invasivas como la búsqueda de marcadores tumorales en sangre o la presencia de células malignas en el líquido cefalorraquídeo.

En la mayoría de los casos se suele realizar el acto quirúrgico con los datos de imagen y se realiza una biopsia intraoperatoria. En el caso del glioblastoma multiforme, normalmente el diagnóstico por imagen es prácticamente definitivo.

Los gliomas son tumores muy heterogéneos desde el punto de vista histológico y molecular. El grado de anaplasia constituye el parámetro histológico más decisivo en la supervivencia de pacientes con glioma. Los indicadores histológicos de anaplasia de los gliomas malignos son: la atipia nuclear, el número de mitosis, la proliferación vascular y la presencia de necrosis<sup>83</sup>. Con estos indicadores se pueden hacer varias clasificaciones, como son las de la OMS y la de St. Anne/Mayo. Todas estas se pueden resumir en una única tabla (tabla 1.6)

<b>Grado OMS</b>	<b>OMS</b>	<b>St. Anne</b>	<b>Criterios de Daumas-Duport</b>
I	Astrocitoma pilocítico	-	0 criterios
II	Astrocitoma bajo grado	Astrocitoma G1 Astrocitoma G2	1 criterio
III	Astrocitoma anaplásico	Astrocitoma G3	2 criterios
IV	Glioblastoma multiforme	Astrocitoma G4	3 o 4 criterios

**TABLA 1.6. Equivalencia entre la clasificación de la OMS y la de St. Anne.**

Por lo tanto el glioblastoma multiforme se caracteriza por presentar tejido tumoral heteromorfo, en que pueden predominar focos de alta celularidad hechos de células redondas anaplásicas, focos fusocelulares y focos de células pleomórficas multinucleadas. El tejido tumoral, además, muestra constantemente focos necróticos y gran proliferación vascular en forma de asas, ovillos y bandas vasculares.

La significación pronóstica se expresa en tiempo de supervivencia desde el momento de hacer el diagnóstico en casos con eventual resección quirúrgica, pero sin radioterapia ni quimioterapia.

- **Grado I:** supervivencia de 5 años o más; eventual curación.
- **Grado II:** supervivencia de 3 a 5 años.
- **Grado III:** supervivencia de 1 a 3 años.
- **Grado IV:** supervivencia de menos de 1 año.

### **1.6.2. FACTORES CLÍNICOS.**

Las dos variables clínicas más importantes son la edad y el estado mental según la Escala de Karnofsky (KPS).

#### **ESCALA DE KARNOFSKY**

La escala de KPS<sup>84</sup> mide la capacidad de los pacientes con cáncer a la hora de realizar tareas rutinarias. Es la herramienta más utilizada para medir la calidad de vida de pacientes con tumores cerebrales. Los valores del test oscilan entre 0 y 100. Por lo tanto, pacientes con un índice de KPS igual o superior a 70 tienen un mejor pronóstico, mientras que pacientes con una puntuación de 50 o inferior indica

elevado riesgo de muerte durante los 6 meses siguientes.

<b>ESTADO FUNCIONAL O DE DESEMPEÑO FÍSICO SEGÚN KARNOFSKY</b>		
<b>CATEGORÍAS GENERALES</b>	<b>%</b>	<b>CARACTERÍSTICAS DEL PACIENTE, NIVEL DE ACTIVIDAD</b>
<b>Capaz de realizar actividades normales, no requiere cuidados especiales</b>	100	Actividad normal. Sin síntomas ni evidencia de enfermedad.
	90	Actividad normal. Signos y síntomas leves de enfermedad.
	80	Actividad normal con esfuerzo. Algunos signos o síntomas de enfermedad.
<b>Incapaz de trabajar, puede vivir en casa y auto cuidarse con ayuda variable</b>	70	Cuida de sí mismo pero es incapaz de llevar una actividad o trabajo normal.
	60	Necesita ayuda ocasional de otros pero es capaz de cuidar de sí mismo para la mayor parte de sus necesidades.
	50	Requiere ayuda considerable de otros y cuidados especiales frecuentes.
<b>Incapaz de su autocuidado. Requiere cuidados especiales susceptibles de hospitalización. Probable avance rápido de la enfermedad</b>	40	Incapacitado. Requiere cuidados especiales.
	30	Severamente incapacitado. Indicación de hospitalización aunque no hay indicios de muerte inminente.
	20	Gravemente enfermo. Necesita asistencia activa de soporte.
	10	Moribundo
	0	Fallecido

**TABLA 1.7. Escala de Karnofsky. Fuente <sup>84</sup>**

**EDAD**

Los pacientes con mayor edad tienen peor pronóstico. Los pacientes jóvenes son más propensos a tener una supervivencia más prolongada, incluso sin un KPS previo bueno. Los pacientes de más de 65 años pueden tener tumores con diferentes perfiles moleculares, lo cual confiere un patrón tumoral más agresivo, y explicaría el por que los pacientes mayores tienen peor resultado clínico, a pesar de medidas terapéuticas agresivas <sup>85</sup>.

En 2009, se publicó un análisis de datos de 118 pacientes con GBM, tratados en el hospital Clínico Universitario de Bucarest <sup>86</sup>. Aquellos pacientes de menos de 60 años presentaron la tasa más elevada de supervivencia.

<b>GRUPO DE EDAD</b>	<b>SUPERVIVENCIA MEDIA (número de pacientes)</b>
20-40	68 semanas (19)
40-60	57 semanas (35)
> 60	40 semanas (68)
<b>FACTORES PRONÓSTICOS FAVORABLES</b>	<b>FACTORES PRONÓSTICOS DESFAVORABLES</b>
Edad entre 20-40 años	Mayor de 60 años
Karnofsky >70 puntos	Karnofsky < 70 puntos
Grado de resección quirúrgica	Biopsia cerebral
Masa tumoral única	Tumor multifocal o multicéntrico

**TABLA 1.8. Factores pronósticos y de supervivencia en una cohorte de pacientes en función de la edad. Fuente <sup>86</sup>.**

### **1.6.3. FACTORES TERAPÉUTICOS**

La extensión de la cirugía es el factor pronóstico más importante entre las variables terapéuticas estudiadas. Los pacientes con resección total tienen mejor pronóstico que aquellos a los que sólo se realiza biopsia <sup>82</sup>.

Según un estudio realizado a partir de la base de datos del grupo de Oncología Radioterapéutica (RTOG) que incluyó a 645 pacientes con diagnóstico de glioblastoma multiforme, los pacientes con resección completa tuvieron una mediana de supervivencia de 11,3 meses frente a 10,4 meses si la resección era parcial o 6,6 meses si sólo se practicaba biopsia <sup>87</sup>.

Además los meta-análisis han demostrado una pequeña pero consistente mejoría de la supervivencia de uno a dos años en el 5-10% de los pacientes con glioblastomas multiformes que recibieron quimioterapia adyuvante junto con radioterapia <sup>88, 89</sup>.

### 1.6.4. FACTORES MOLECULARES

- **Factores relacionados con el metabolismo oxidativo.** Mutaciones en el gen isocitrato deshidrogenasa (IDH) fueron reconocidos desde 2008 como un evento temprano en el origen de los gliomas<sup>47</sup>.

Como se ha comentado previamente, los pacientes con IDH mutado tienen mejor pronóstico comparado con los que IDH-no mutados de similar grado histopatológico<sup>56</sup>. Sin embargo, sólo el 5-10% de los glioblastomas presentan esta mutación, que aparece más frecuentemente en pacientes jóvenes.

Las mutaciones isocitrato deshidrogenasas 1 y 2 son prácticamente específicas de gliomas, aunque también han sido identificadas en la leucemia mieloide aguda.

La mutación IDH 1 más frecuente (alrededor de un 90% de todas las mutaciones IDH) puede ser demostrada mediante inmunohistoquímica, mientras que las mutaciones IDH2 y mutaciones IDH1 en otros sitios se puede identificar sólo por secuenciación.

- **Factores relacionados con la respuesta farmacológica: MBT.** El gen O<sup>6</sup> – metilguanina-ADN-metiltransferasa codifica para una importante proteína reparadora de ADN que protege al genoma de la célula de los efectos mutagénicos de los agentes alquilantes como la temozolamida. La alquilación del ADN en la posición O<sup>6</sup> de la guanina es uno de los eventos más críticos que permiten la inducción de mutaciones de transición y cáncer<sup>90</sup>. Debido a esto se ha propuesto MGMT como un factor pronóstico en el cual los pacientes que no expresan dicha proteína, es decir, que la tienen silenciada responden mejor al tratamiento con temozolamida. La expresión de MGMT se considera por lo tanto un factor de resistencia frente al tratamiento.

En resumen, la hipermetilación del gen MGMT puede llevar al silenciamiento del gen y a reducir la concentración proteica de la MGMT, lo que resulta en una disminución de la capacidad de reparación del ADN<sup>91, 92</sup>.

La determinación de MGMT depende del contexto diagnóstico y terapéutico del paciente<sup>93</sup>. Ante la ausencia de justificación clínica o terapéutica, no es necesario realizar la determinación de MGMT en todos los pacientes (grado de evidencia V,D); sin embargo en pacientes mayores en los que el pronóstico puede mejorar con una estrategia de tratamiento adaptado [quimioterapia con temozolamida (TMZ) en tumores MGMT metilados, radioterapia para los no metilados] ha sido demostrado en dos ensayos aleatorizados (grado de evidencia II,A)<sup>94, 95</sup>. Este punto se explica más detalladamente en el apartado de tratamiento.

La metilación del promotor MGMT está altamente asociada con las mutaciones LOH 1p/19q y mutaciones IDH1<sup>96</sup>.

## INTRODUCCIÓN

- **La codelección de cromosomas 1P/19Q** o pérdida de la heterocigosidad 1p/19q incrementa la respuesta al tratamiento con radioterapia y quimioterapia, aunque como ya se ha comentado previamente es una mutación característica de oligodendrogliomas.

	<b>MUTACIONES IDH1, IDH2</b>	<b>CO-DELECCIÓN 1P/19Q</b>	<b>METILACIÓN DEL PROMOTOR MGMT</b>
<b>Consecuencia biológica</b>	Incrementa los niveles de 2-hidroxiglutarato, ligado al fenotipo G-CIMP	No aclarado, los genes CIC y FUBP1 están en proceso de investigación	Repara el ADN dañado y se asocia con el fenotipo G-CIMP en tumores IDH1/2
<b>Métodos de valoración</b>	Inmunohistoquímica para IDH1 R-132 Si negativo, secuenciación genética	Técnica FISH	MSP, MS o secuenciación (bisulphite, pyro sequencing)
<b>Frecuencia WHO grado II</b>			
<b>Astrocitoma difuso</b>	70-80%	15%	40-50%
<b>Oligodendroglioma/ oligoastrocitoma</b>	70-80%	30-60%	60-80%
<b>WHO grado III</b>			
<b>Astrocitoma anaplásico</b>	50-70%	15%	50%
<b>Oligodendroglioma/ oligoastrocitoma anaplásico</b>	50-80%	50-80%	70%
<b>WHO grado IV</b>			
<b>Glioblatoma</b>	5-10%	<5%	35%
<b>Importancia diagnóstica</b>	DD glioma vs gliosis Típico de glioma de bajo grado transformado	Patognomónico de oligodendroglioma	Ninguno
<b>Importancia en el pronóstico</b>	Historia natural de tumores IDH mutados	Historia natural de tumores con codelección 1p/19q	Pronóstico de pacientes con gliomas anaplásicos (posiblemente)

			IDH mutados) tratados con radioterapia o QMT alquilante
<b>Valor predictivo</b>	Ausencia de mutación sugiere la metilación del promotor MGMT	Prolongación de la supervivencia si se emplea quimioterapia temprana en oligodendrogliomas con codeleción 1p/19q	Beneficio de emplear QMT con agentes alquilantes. En pacientes ancianos con MGTM metilado se emplea TMZ y si no está metilado se utiliza sólo RT

**TABLA 1.9. Marcadores moleculares en glioblastomas multiformes. Fuente**<sup>91</sup>

### **1.7. TRATAMIENTO Y PRONÓSTICO:**

El tratamiento es multidisciplinar, el cual incluye cirugía con la resección del tumor y tratamiento adyuvante de radioterapia y quimioterapia.

#### **1.7.1. CIRUGÍA**

Algunas de las técnicas empleadas para identificar el tamaño y la localización del tumor son: la esteroataxia (localización de lesión a través de un sistema de coordenadas tridimensional), los sistemas de navegación (instrumentos informáticos que fusionan las imágenes radiológicas durante la intervención para una mejor localización del tumor), la microcirugía o la utilización de la fluorescencia intraoperatoria (se utiliza un contraste fluorescente que es metabolizado por el tejido cerebral y que tiñe de forma diferente el tejido tumoral y el sano).

Se recomienda la extirpación quirúrgica lo más extensa posible con preservación de la función neurológica, con el fin de conseguir:

- un diagnóstico histológico preciso, y evitar así la infravaloración histológica que a veces ocurre con la biopsia esteroatáxica
- una mejora de la sintomatología que el efecto de masa provoca (edema, hidrocefalia...)
- permite la administración y una mayor eficacia de la radio-quimioterapia posterior
- y además consigue un modesto, pero significativo impacto en la supervivencia.

A pesar de no existir evidencia demostrada, existe un acuerdo casi general de que la máxima resección tumoral mejora la supervivencia. Además la resección del tumor se considera un factor pronóstico por sí solo, como se ha indicado previamente.

#### **1.7.2. RADIOTERAPIA**

En 1978, un estudio realizado por Walker y colaboradores<sup>97</sup>, indicó que el tratamiento con radioterapia adyuvante a la cirugía aumentaba la supervivencia de 14 a 36 semanas, lo que suponía un aumento de la esperanza de vida del 150%. A partir de estudios como éstos la radioterapia se convirtió en un tratamiento estándar.

La radioterapia puede dañar al tejido neurovascular que rodea al tumor por lo que es importante planificar el tratamiento, para ello se realiza un mapeo previo con una prueba de imagen (RM cerebral preferentemente o TC en caso de que ésta no pueda realizarse).

El tratamiento estándar de radioterapia incluye un período de 6 semanas con un plan de tratamiento en relación con el volumen diana residual. El GBM es un tumor infiltrativo, por que se aplican márgenes tumorales amplios. Los últimos estudios apuntan a que un aumento de la dosis de radiación no influye de modo significativo en la supervivencia.



Existen distintas técnicas de radioterapia como son la radioterapia externa convencional, la radioterapia externa esterotáxica o radiocirugía y la radioterapia intersticial o braquiterapia. En cada caso se individualizará qué técnica es la más indicada.

### **1.7.3. QUIMIOTERAPIA**

Existen dos métodos de administración de quimioterapia:

- Quimioterapia local: carmustina. *BCNU intersticial*.
- Quimioterapia sistémica: temozolamida

#### **Quimioterapia local: carmustina.**

La carmustina (BCNU) se administra de forma local mediante un polímero biodegradable en la cavidad quirúrgica durante la operación de resección. Existen estudios que demuestran un aumento en la supervivencia en pacientes tratados con cirugía + BCNU + RDT, frente a aquellos tratados con cirugía + placebo + RT.<sup>98</sup>

Este tratamiento está contraindicado en caso de infección intracerebral activa, edema cerebral importante, lecho quirúrgico hemorrágico y en tumores profundos o irresecables o multifocales o bilaterales o situados en áreas elocuentes.

#### **Quimioterapia sistémica: temozolamida**

La temozolamida es un agente alquilante de segunda generación, de administración oral que tiene una biodisponibilidad del 100%. El mecanismo de acción es inhibir la replicación del ADN.

A partir de los ensayos de la EORTC (European Organisation for Research and Treatment of Cancer)<sup>99</sup> se demostró el uso de la temozolamida (TMZ) como adyuvante de la radioterapia, el cual incrementaba la media de supervivencia frente a la radioterapia sola. La temozolamida es especialmente útil en pacientes con la metilación MBT<sup>100</sup>.

En nuestro hospital se realiza el **protocolo** de tratamiento de radioterapia en combinación con temozolamida (TMZ) como tratamiento postquirúrgico de primera línea en GBM.

La combinación de RDT y QMT con Temozolamida (TMZ) ha demostrado aumentar la mediana de supervivencia entre 2 a 5 años en ensayos clínicos aleatorizados, y es el actual tratamiento estándar para pacientes con gliomas de alto grado (grado III y IV)<sup>99, 101</sup>.

Estándar (régimen Stupp 314) en pacientes menores de 70 años.

- Radioterapia con planificación tridimensional hasta alcanzar una dosis total de 60Gy, mediante un fraccionamiento de 2Gy/día, 5 días/semana, en un campo que incluya de 1-2 cm alrededor de la imagen de captación de contraste definida en T1 o todo el volumen anormal definido en la imagen de T2. Se añade a este tratamiento TMZ 75mg/m<sup>2</sup>/día por 7 días/semana, las 6 semanas de la radioterapia (grado de evidencia IA en pacientes entre 18 y 70 años).
- Seguimiento de TMZ adyuvante, 6 ciclos de 5 días cada 28 días a 150-200

mg/m<sup>2</sup>/día. La toxicidad aguda más frecuente son náuseas y vómitos (requiere tratamiento antiemético), linfopenia (se aconseja profilaxis pneumocistis si hay uso crónico de dexametasona), neutropenia y trombocitopenia (requiere control hematológico a partir de la tercera semana de forma semanal hasta completar las seis semanas de tratamiento). En caso de persistir la enfermedad y siempre que no haya criterios de progresión se puede administrar la administración de TMZ hasta 12 ciclos.

Debido a que los pacientes ancianos tienen menor supervivencia y peor pronóstico se emplean pautas de tratamiento más cortas, simples y menos intensas.

Tratamiento postquirúrgico en pacientes ancianos (> 70 años).

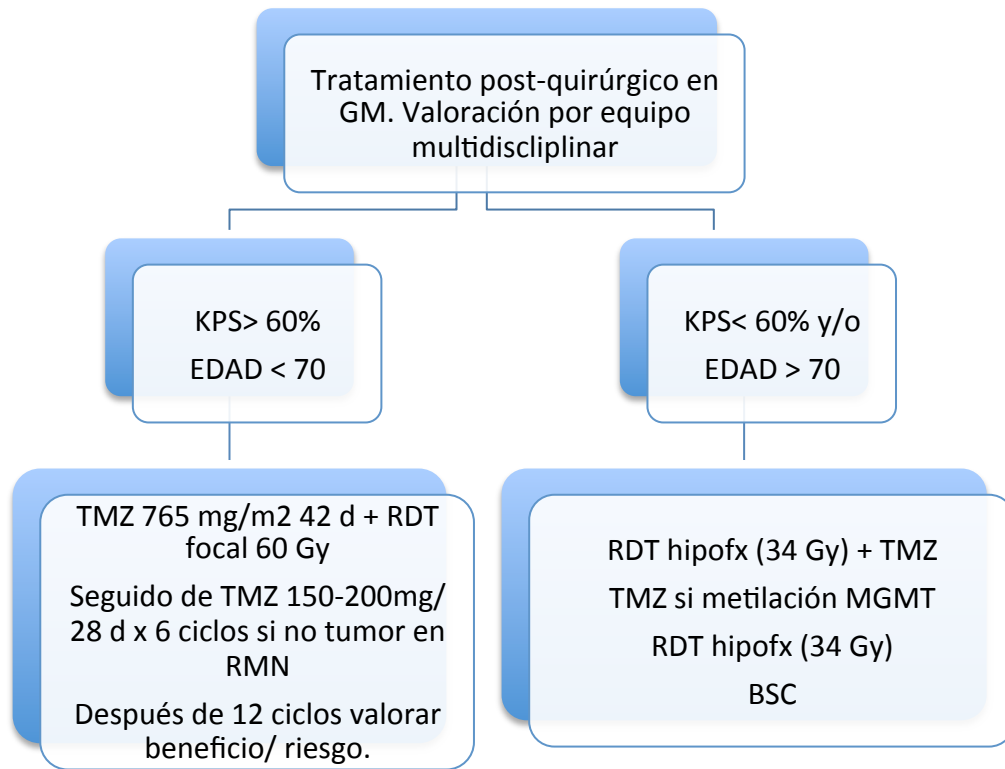
- No hay estudios de combinación de RDT-TMZ por lo que se deberá individualizar en función de la edad y del estado funcional la indicación o no de RDT + TMZ concomitante (evidencia IVD).
- La RDT hipofraccionada (34 Gy- 3,4 Gy x 10 fracciones) no es peor que a dosis de 60 Gy, siendo ésta particularmente útil en enfermos mayores de 70 años<sup>102, 94</sup>.
- La temozolamida a dosis de 150 mg/m<sup>2</sup>/1-5 días cada 28 en presencia de metilación del promotor de la enzima MGMT aporta supervivencias medias en un ensayo fase II de 7,7 meses (IC 95% 6,25-11,7 meses)<sup>94, 95</sup>.

De manera que según lo anteriormente expuesto, se recomienda el siguiente protocolo de actuación en pacientes >70 años con gliomas de alto grado:

- En torno a 70 años, PS>70% sin comorbilidad y MME > 27/30: tratamiento estándar, RDT/TMZ seguido de TMZ en régimen Stupp.
- 70 años y KPS > 70 : RDT hipofraccionada (34 Gy) + TMZ concomitante a dosis de 75mgr/m<sup>2</sup>.
- >70 años y KPS< 70%: si MGMT metilado TMZ a dosis de 150 mgr/m<sup>2</sup> 5 días cada 28. Si MGMT no metilado: RDT hipofraccionada (34 Gy) vs BSC.

El paciente con sólo biopsia es un candidato ideal para estudios de neoadyuvancia<sup>103</sup> y se tratan igual que si fuese una exeresis parcial.

En caso de resección parcial/biopsia, si el enfermo mantiene KPS<70%, MME> 27-30 y edad menor de 70 años se valorará en comité el según el esquema de Bevacizumab del ensayo Geino 009.



**FIGURA 1.6. Algoritmo del manejo terapéutico del glioblastoma multiforme. Protocolo HCUVA.**

### **1.8. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL**

El diagnóstico diferencial por imagen incluye:

- Metástasis cerebrales: si son únicas pueden ser indistinguibles. Las metástasis suelen ser lesiones múltiples con localización típica en la unión sustancia gris-blanca.
- Linfoma cerebral primario: debería ser considerado especialmente en paciente con VIH, en los que la necrosis central es más común. Por otro lado es más frecuente el realce homogéneo en el linfoma. El GBM puede propagarse a través del cuerpo calloso (glioma en mariposa) cuyo principal diagnóstico diferencial es el linfoma.
- Absceso cerebral: La restricción de la señal central en secuencias de difusión ayuda al diagnóstico diferencial. La capsula tumoral del GBM mostró una elevación del coeficiente aparente de difusión (ADC), sugiriendo un aumento de la fracción de agua tanto intra como extracelular. Además también es de utilidad el espectro específico de la cavidad del absceso que muestra elevación de lactato, acetato, succinato y de algunos aminoácidos, posiblemente secundario al realce de la glicólisis y a la fermentación de los microorganismos infecciosos<sup>104</sup>.
- Astrocitoma anaplásico: no debería de tener necrosis central.
- Desmielinización tumefactiva (ADEM): puede parecer similar. A veces las lesiones presentan un realce incompleto en forma de herradura abierto a la corteza. Se trata de lesiones en localizaciones típicas y en pacientes jóvenes.
- Infarto cerebral subagudo. Se localizan en territorios vasculares típicos (arteria cerebral media, arteria cerebral posterior, arteria cerebral anterior). La historia clínica es esencial para el diagnóstico.

### **1.9. LA IMPORTANCIA DEL TEJIDO PERITUMORAL**

El 90% de las recurrencias en el GBM ocurren en el área peritumoral <sup>105</sup>, de lo que se puede deducir que la invasión infiltrativa de las células de GBM no está sólo limitada a sus márgenes distinguibles con técnicas macroscópicas o de imagen. El frente de infiltración <sup>106</sup>, clásicamente poco estudiado y sin repercusión en la gradación del estadio tumoral y la toma de decisiones terapéuticas, parece un lugar clave para actuar con las nuevas terapias inmunológicas <sup>107</sup> (anticuerpos monoclonales, vacunas y terapias génicas) que están hoy en día bajo investigación. Por lo tanto existe un interés creciente en estudiar de manera más precisa el tejido peritumoral <sup>108</sup> con el fin de mejorar el manejo terapéutico individualizado a cada paciente.

#### **1.9.1. HISTOLOGÍA DEL TEJIDO PERITUMORAL**

El GBM es un tumor cerebral altamente invasivo, con afectación vascular prominente, caracterizado por cambios en los vasos sanguíneos e invasión gradual y predominante del tumor a través del espacio perivascular <sup>109, 110</sup>.

##### **1.9.1.1. MICROVASCULATURA CEREBRAL NORMAL**

La microvasculatura cerebral normal está compuesta de capilares sanguíneos, que están formados por dos componentes celulares independientes, las células endoteliales y los pericitos <sup>111, 112</sup>.

Las arterias grandes y medianas penetran en el parénquima desde la superficie cerebral, sumergidas en el líquido cefalorraquídeo, que las separa de la lámina pial de cerebro; donde los pies terminales de los astrocitos forman la barrera astrogliar. Cuando las arterias van disminuyendo en diámetro para convertirse en capilares, pierden la capa muscular de su pared, siendo sustituidas por los pericitos, que se disponen por fuera del endotelio vascular, con el que comparten parcialmente la membrana basal, y la piamadre. Así, los capilares sanguíneos del cerebro están formados por un endotelio continuo (EC) formado por complejas uniones intercelulares. Alrededor de ellos nos encontramos los pericitos, en el espacio virtual residual entre las membranas basales vascular y neuronal, y por fuera de ésta, los pies vasculares de los astrocitos. Todos estos elementos contribuyen a formar la barrera hemato-encefálica (BHE), y forman la unidad neurovascular (figura 1.7).

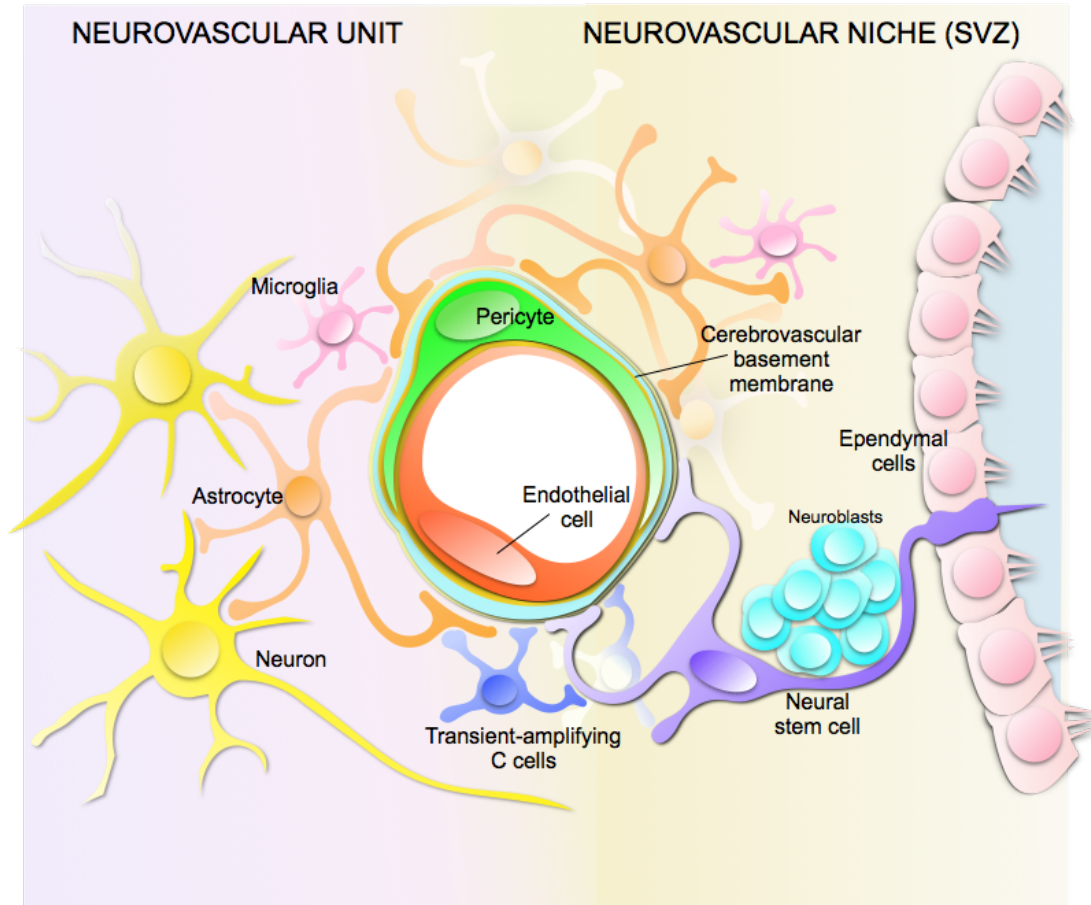
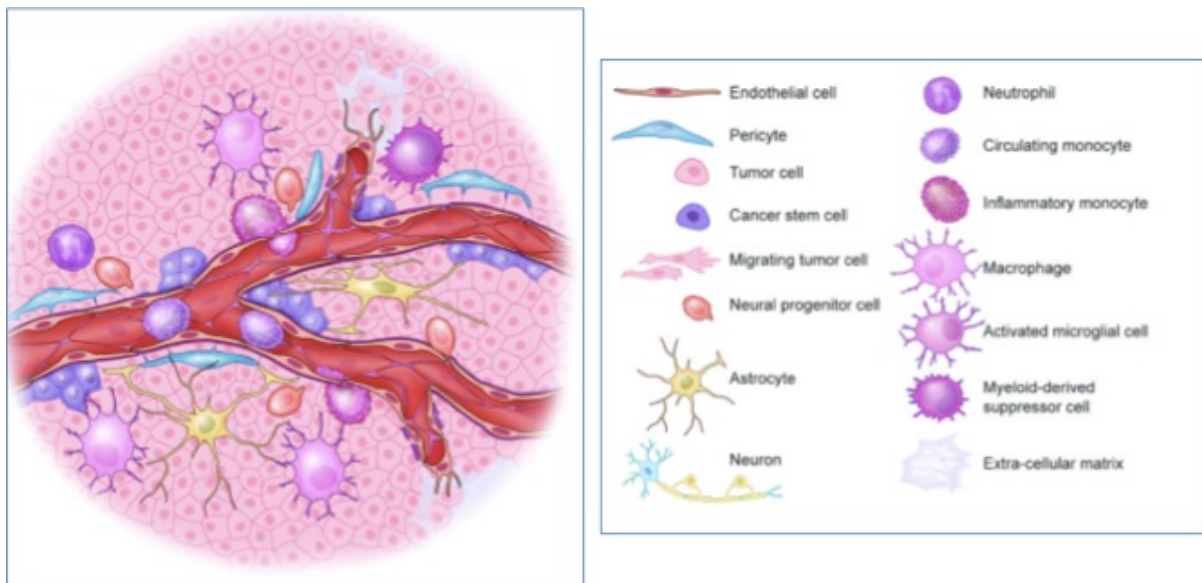


FIGURA 1.7. Representación de la microvasculatura cerebral normal. Figura de fuente<sup>113</sup>

**1.9.1.2. EL NICHOS PERIVASCULAR TUMORAL**

Desde 1971, según Folkman <sup>114</sup>, se consideró que el crecimiento tumoral era tan sólo “dependiente de la angiogénesis” que a través del flujo sanguíneo proporcionaba nutrientes y oxígeno al tumor.

Actualmente se sabe que la unidad neurovascular representa el nicho perivascular, un entorno privilegiado para el soporte, expansión y crecimiento del tumor, donde se encuentran células con propiedades de células madre <sup>115</sup>. El nicho perivascular es una estructura multi-celular compuesta por células no neoplásicas (células endoteliales, pericitos, macrófagos, neutrófilos, células mieloides supresoras, astrocitos reactivos, células progenitoras de origen neural) así como células neoplásicas que incluyen a las células tumorales y a las células madre tumorales <sup>116</sup>.



**FIGURA 1.8. Representación de un nicho perivascular en GBM. Figura de fuente 116**

El nicho perivascular juega un papel fundamental para mantener el microambiente adecuado para la supervivencia de la célula madre tumoral y la progresión tumoral. Nuestra hipótesis es que los pericitos son la principal diana de las células tumorales del frente de infiltrativo y tienen un papel fundamental en la proliferación, expansión y supervivencia tumoral, así como la regulación del sistema inmune, según los mecanismos que se explican a continuación.

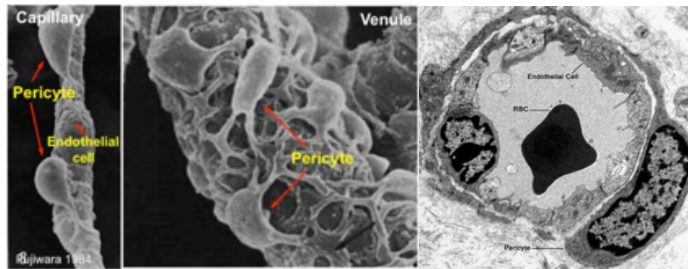
### 1.9.2. ¿QUÉ SON LOS PERICITOS?

Los pericitos se describieron por primera vez hace más de cien años como células que rodeaban los capilares sanguíneos (*peri: alrededor y cito: célula*).

El análisis al microscopio electrónico demostró la morfología del pericito; el cual está formado por un núcleo prominente y escaso citoplasma que posee varias prolongaciones que abrazan la pared luminal del endotelio.

Existen uniones GAP entre el citoplasma del pericito y las células endoteliales que permiten el intercambio de iones y pequeñas moléculas.

El pericito expresa además muchas características de actividad de músculo liso.



**FIGURA 1.9.** Representación del pericito cerebral por técnicas de microscopía electrónica de barrido y microscopía electrónica de transmisión.

#### 1.9.2.1. MARCADORES MOLECULARES DEL PERICITO

Existen varios marcadores que están presentes en el pericito, y aunque no son exclusivos de éstos se utilizan para su detección.

Para identificar pericitos se utilizan anticuerpos contra las siguientes proteínas:

- Proteínas intracelulares: La alpha-actina de músculo liso y desmina.
- Proteoglicano condroitina sulfato NG2 (neuron-gliar 2) o también llamado antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular o HMWMAA. Se expresa en la superficie del pericito durante el proceso de angiogénesis<sup>117</sup>.
- Receptor tirosin-quinasa PDGFR- $\beta$ .

#### 1.9.2.2. FUNCIONES DEL PERICITO

Las diversas funciones del pericito son:

- El pericito controla y regula el flujo sanguíneo. Los pericitos son células estromales perivasculares que se localizan en la pared del vaso y, debido a la presencia de miofibrillas de proteínas contráctiles en su citoplasma ( $\alpha$ -SMA, tropomiosina y miosina), regulan el tono y la morfología vascular, de manera similar a como las células musculares lisas lo hacen en los vasos sanguíneos medianos y grandes regulan su tono y la morfología, de manera similar a como las células musculares lisas lo hacen en los grandes vasos sanguíneos.

<sup>118</sup>Los pericitos pueden producir vasoconstricción y vasodilatación en el lecho capilar regulando el diámetro del vaso y el flujo capilar sanguíneo. Además los pericitos poseen receptores colinérgicos y adrenérgicos ( $\alpha$ 2 y  $\beta$ 2). La



respuesta beta-adrenérgica condiciona relajación en los pericitos, mientras que la alfa2 respuesta es antagonista y produce contracción. Otras sustancias vasoactivas que se unen al pericito son la angiotensina II y la endotelina I <sup>119</sup>.

- **Funciones específicas del tejido.**
  - En muchos órganos como el cerebro, el hígado y los riñones, los pericitos
  - han desarrollado unas funciones específicas:
  - En el hígado los pericitos reciben el nombre de las células estrelladas hepáticas, células de Itoh o adipocitos hepáticos y se encuentran en el espacio perisinusoidal de Disse.
  - En el riñón los pericitos se llaman células mesangiales y se localizan en los capilares glomerulares.
- **CEREBRO.** En el cerebro se localiza la mayor densidad de pericitos del cuerpo. La razón de ellos es porque en el cerebro está la barrera hematoencefálica (BHE) la cual está formada por una red continua de células endoteliales que interactúan con astrocitos y pericitos, con la función de proteger a las neuronas de factores tóxicos derivados de la sangre.  
Además los pericitos cerebrales pueden tener propiedades de células madre vasculares y actuar como células pluripotenciales (pueden proliferar y convertirse en células endoteliales) desempeñando entre otras, una función inmunológica en el cerebro, con características de células presentadoras de antígeno <sup>120 121</sup>. De hecho se ha demostrado que tienen actividad fagocítica y expresan marcadores de macrófagos moleculares <sup>122, 123</sup> tales como el receptor del complemento CR3, CD4, moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC I y II) y ED-2 <sup>120</sup>.

### **1.9.2.3. LOS PERICITOS EN LOS TUMORES**

#### **1.9.2.3.1. ANGIOGÉNESIS Y CRECIMIENTO TUMORAL**

Los pericitos de los tumores difieren de los pericitos normales. En general, los pericitos tumorales están menos adheridos a la vasculatura y su citoplasma se puede extender hacia el tejido tumoral. En glioblastomas y en el cáncer de mama se ha demostrado una importante disminución de los pericitos respecto al tejido normal. Es por ello que se ha considerado que los pericitos tenían una **contribución importante en la angiogénesis tumoral**, aunque las verdaderas causas del comportamiento del pericito tumoral siguen siendo desconocidas.

Se ha demostrado que las células madre gliales (GSC glial stem cell) promueven la angiogénesis tumoral a través de elevar la expresión de VEGF <sup>124</sup>.

Las células madre gliales se pueden localizar en el espacio perivascular e interactuar con las células endoteliales de manera bidireccional<sup>125</sup>. Dentro de este contexto, se sugirió que las células madre gliales podrían diferenciarse en células endoteliales<sup>126, 127, 128</sup>. No obstante se ha demostrado que las células endoteliales no tienen alteraciones genéticas tumorales en el GBM<sup>129, 130</sup>.

Recientemente se ha descubierto que las células madre del GBM pueden diferenciarse en pericitos tumorales durante el proceso de angiogénesis. No obstante, a pesar de que los últimos estudios subrayan el papel de los pericitos en la formación de nuevos vasos, muy poco se conoce a cerca de la función del pericito en la infiltración tumoral.

Sin embargo existen múltiples razones para considerar a las células madre gliales como precursores potenciales de los pericitos. Las células madre gliales tienen capacidad de diferenciación mesenquimal<sup>131, 132</sup> y comparten características con las células madre neuronales que sí tienen la propiedad de diferenciarse en pericitos<sup>133, 134</sup>. Además los pericitos son similares a las células madre mesenquimales<sup>135</sup>. Por tanto existe la teoría de que las células madre gliales podrían generar pericitos vasculares y contribuir al remodelado vascular y al crecimiento tumoral del GBM<sup>136</sup>.

La angiogénesis tumoral se define como la formación de nuevos vasos a partir de la proliferación de las células endoteliales de vasos sanguíneos preexistentes y es un sello distintivo en la progresión tumoral<sup>137</sup>.

Sin embargo, existe evidencia científica de que los tumores primarios y metástasis son capaces de progresar sin angiogénesis, como por ejemplo el cáncer de pulmón de células pequeñas<sup>138, 139</sup> el linfoma<sup>140</sup> y el glioblastoma multiforme<sup>141</sup>.

Además se ha descrito también este mecanismo en las metástasis de algunos órganos como son el pulmón<sup>142</sup>, hígado<sup>143, 144, 145</sup> y ganglios linfáticos<sup>146</sup>.

La **cooptación vascular** consiste en interacción de las células tumorales del GBM con los vasos sanguíneos preexistentes para promover la infiltración y la progresión tumoral. Es un mecanismo mediante el cual los tumores obtienen el aporte sanguíneo a través del secuestro de la vasculatura preexistente y las células tumorales migran a lo largo de los vasos del huésped.

Las bases moleculares y celulares de la cooptación son actualmente desconocidas.

La coaptación vascular a parte de ser importante en la progresión tumoral, explicaría por qué los tratamientos antiangiogénicos tienen un efecto menor del esperado.<sup>147</sup>

Debido a que los pericitos se localizan en la pared de los vasos son buenos candidatos para desempeñar el papel de mediadores que ocurre en la cooptación entre las células tumorales y los vasos sanguíneos<sup>122</sup>.

### **1.9.2.3.2. RESISTENCIA AL TRATAMIENTO**

Por otro lado se ha demostrado que los vasos tumorales que tienen menos pericitos son más vulnerables al tratamiento de quimioterapia y radioterapia, sugiriendo que los pericitos son críticos para proteger a las células endoteliales y podrían promover la resistencia terapéutica<sup>148, 149</sup>.

Cuando la diana terapéutica son las células endoteliales de los tumores, la red de pericitos puede mantener un núcleo funcional de vasos sanguíneos pre-existentes. Esta vasculatura tumoral frecuentemente exhibe anomalías funcionales y estructurales con pericitos irregulares en los tubos endoteliales. La interacción pericito-célula endotelial difiere sustancialmente entre tejido tumoral y tejido normal<sup>150, 151</sup>.

Sin embargo, los mecanismos subyacentes son pobremente conocidos. Para mejorar el conocimiento del desarrollo y mantenimiento vascular en los tumores y por tanto mejorar la diana terapéutica, es esencial determinar la interacción que existe entre las células tumorales y los comportamientos vasculares.

### **1.9.2.3.3. REGULADORES DE LA INMUNIDAD**

La evidencia sugiere que son reguladores de la inmunidad innata, así dependiendo del contexto pueden mediar tanto en funciones pro-inflamatorias de defensa como en respuestas anti-inflamatorias en respuesta a tumores malignos como el GBM, que incluye la inhibición de la función de células T y la inmunosupresión local<sup>152</sup>. Los pericitos cerebrales han demostrado tener un comportamiento de macrófagos en cultivos, con secreción de citoquinas tales como IL-1 beta, TNF-alfa e IL-6.

El papel de los pericitos en la regulación de la función de las células T está pobremente estudiado. Algunos autores destacan la capacidad de los pericitos pre-activados de crear un ambiente inflamatorio que presente los antígenos a las células T mediante las células presentadoras de antígenos (MHC)<sup>153, 154, 155</sup>. Sin embargo no está claro si los pericitos cerebrales desarrollan una función de defensa para evitar el crecimiento tumoral o si bien podrían hacer que la activación de las células T fracasara y evitara la eliminación del tumor (anergia tumoral)<sup>156</sup>.

Teniendo en cuenta que las células inmunes contribuyen a la progresión tumoral, los pericitos podrían desempeñar un papel crítico para el control local de la cooptación vascular y la modulación del sistema inmune. Nuestra hipótesis de trabajo es que las células de GBM inducen propiedades de inmunotolerancia a los pericitos cerebrales, lo que facilita el crecimiento y la infiltración tumoral.

En nuestro proyecto, hemos obtenido muestras de tejido peritumoral de GBM en quirófano que previamente habían sido seleccionadas a partir del estudio de imagen de RM como las zonas de mayor infiltración peritumoral.

Las muestras de tejido se han utilizado para investigar los mecanismos celulares

por los que la células del GBM exploran el tejido vascular circundante para promover la supervivencia e invasión vascular.



# OBJETIVOS

## OBJETIVOS

## 2. OBJETIVOS PREVISTOS

2.1 Valorar la infiltración peritumoral de los tumores de alto grado mediante RM avanzada difusión (DWI), tensor de la difusión (DTI), espectroscopia multivoxel y perfusión.

2.2. Valorar la alteración en la microvasculatura cerebral peritumoral en relación con los pericitos. Demostrar que los pericitos son los que condicionan la malformación vascular y no la neovascularización.

2.3. Buscar marcadores radiológicos reproducibles en la infiltración tumoral que puedan correlacionarse con las alteraciones inmuno-histoquímicas estudiadas en la pieza quirúrgica.

2.4. Establecer si los marcadores radiológicos e histológicos en el momento del diagnóstico pueden correlacionarse con la supervivencia global.



## OBJETIVOS

# MATERIAL Y MÉTODOS



## **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **3.1 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN**

El inicio de la investigación del “proyecto GLIO” tuvo lugar a principios del año 2013 a partir de unas reuniones de contacto entre el Servicio de Radiodiagnóstico, Oncología, Neurocirugía, Biobanco y el Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria (IMIB). Desde esa fecha se decidió realizar un estudio para establecer la correlación in-muno-histo-radiológica en pacientes con tumores gliales de alto grado que requería la colaboración de radiólogos, neurocirujanos, Biobanco y del IMIB. Se realizaron diversas reuniones en las que se fueron perfilando las características de la investigación.

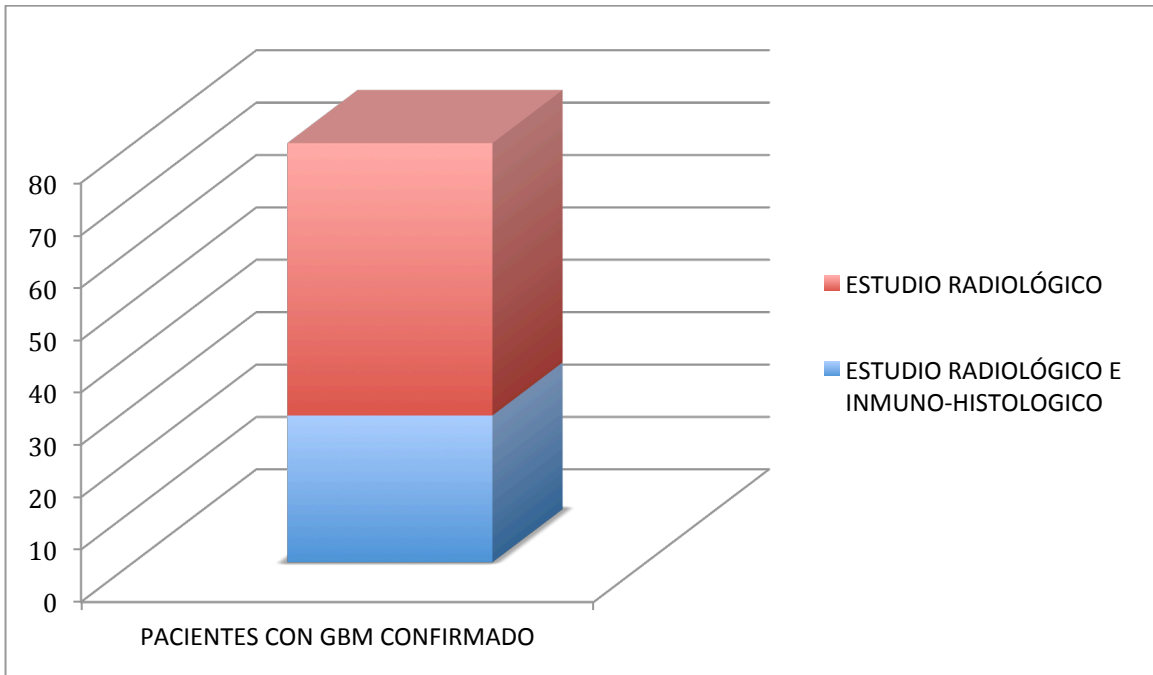
El tipo de estudio realizado fue prospectivo, de cohortes y transversal.

### **3.2. POBLACIÓN DE PACIENTES**

Estudio prospectivo en un grupo de pacientes con diagnóstico radiológico compatible con glioblastoma multiforme diagnosticados a partir de una RM cerebral realizada en nuestro hospital.

El estudio incluyó 75 pacientes, durante un período de 34 meses, desde Enero 2013 a Noviembre 2015. De los 75 pacientes diagnosticados, 70 de ellos fueron confirmados histológicamente como glioblastomas multiformes (grado IV de la OMS) mediante resección quirúrgica. Ninguno de ellos había recibido previamente radiación ni quimioterapia. Hubo cinco casos en los que el diagnóstico patológico no fue congruente con el diagnóstico radiológico (dos de linfoma, dos de glioma de bajo grado y otro de infarto cerebral subagudo) por lo que fueron excluidos del estudio. Se incluyeron solamente los pacientes a los que se les realizó resección total del tumor, para que la extensión de la cirugía no influenciara en el análisis de supervivencia.

En 30 casos se realizó también resección quirúrgica de una muestra peritumoral determinada previamente por el radiólogo según los parámetros indicativos de infiltración tumoral obtenidos en las distintas secuencias de RM. De los 30 casos, 28 biopsias resultaron adecuadas para el estudio inmunohistológico.



**FIGURA 3.1. Representación gráfica de los pacientes incluidos en el estudio con GBM confirmado.**

Criterios de inclusión:

- Que el paciente no tomara corticoides previo a la realización del estudio de RM.
- Pacientes mayores de 11 años con diagnóstico radiológico compatible con glioblastoma multiforme estudiados mediante RM cerebral en el Servicio de Radiodiagnóstico del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA).
- Pacientes que fueran a ser operados por el Servicio de Neurocirugía del HCUVA con el fin de realizar escisión quirúrgica.
- Que la zona marcada radiológicamente fuera accesible para el neurocirujano y no supusiera un riesgo añadido para el paciente (regiones elocuentes o vitales del cerebro).
- Que se dispusiera del consentimiento informado de depósito de muestras de Biobanco previo a la realización de la cirugía. La autorización podía ser firmada por el paciente, por un testigo o por un tutor legal según correspondiera en cada caso, posteriormente a ser informados por el facultativo responsable. En la mayoría de los casos el paciente era informado sobre el consentimiento informado por el neurocirujano que le iba a realizar la intervención.

### Criterios de exclusión:

- Que el paciente no fuera candidato a cirugía, bien por su estado basal o porque el tumor no fuese accesible quirúrgicamente.
- Que la zona de interés marcada radiológicamente no fuese accesible quirúrgicamente o supusiese algún riesgo añadido para el paciente (regiones elocuentes o vitales del cerebro).
- Que el paciente, testigo o tutor responsable se negase a participar en el estudio, y por tanto no firmase el consentimiento informado de Biobanco.
- En cualquier momento del proceso, se podía revocar el consentimiento a partir de un documento de revocación que se le entregó al paciente cuando firmó el consentimiento.

Además se comprobó que los pacientes no presentaran otras contraindicaciones generales relativas/absolutas para la realización de RM, así como que estuvieran en ayunas y que el índice de creatinina previo a la administración de contraste iv fuese <1.5.

### **3.3. CONSIDERACIONES ÉTICAS**

Diseño del trabajo de investigación y participantes del estudio. Se solicitó la aprobación del Comité de Bioética del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca de la Región de Murcia (HCUVA) para iniciar el estudio.

La recogida y almacenamiento de muestras fueron autorizadas por el Comité de Bioética, tras el debido consentimiento informado específico del Biobanco de HCUVA para todas las muestras estudiadas, de acuerdo a la LIB 14/2007 y al RD Nov 2011.

Además todos los pacientes firmaron el consentimiento informado para participar en el estudio y para la realización de la RM cerebral.

### **3.4. RECOGIDA DE DATOS**

#### **3.4.1. PRIMERA FASE. ESTUDIO RADIOLÓGICO.**

##### **EVALUACIÓN DE LAS IMÁGENES DE RM**

Las imágenes se obtuvieron con una RM de 1.5T (Achieva; Philips Medical Systems, Best, the Netherlands).

El protocolo de imagen estándar consistía: secuencia localizadora 3 planos, sagital T1 SE CLEAR (TR = 586 ms, TE = 15), axial T2 TSE CLEAR (TR = 4847 ms, TE = 100 ms), coronal T2 TRE CLEAR (TR=3027 ms, TE= 100 ms), axial FLAIR TR (TR = 9000 ms, TE = 123 ms), axial T2\* FFE CLEAR (TR=758, TE= 23 ms), axial postcontraste T1 3D FFE (TR = 25ms, TE = 5 ms) y axial TRA/T1 SPIR (TR=477 ms, TE=20 ms) tras la adquisición de las imágenes de perfusión. Todos los datos se obtuvieron con un grosor de corte de 5mm y un FOV de 24 × 24 cm.

### **3.4.1.1. RM CONVENCIONAL**

En la RM convencional se analizaron los siguientes hallazgos:

- Localización (derecho/izquierdo, lóbulos: frontal, parietal, temporal, occipital, afectación de varios lóbulos o ganglios de la base)
- Tamaño (diámetro máximo del tumor en los tres planos del espacio: axial, coronal y antero-posterior).
- Homogeneidad/heterogeneidad en secuencias T2
- Necrosis/quistes en su interior
- Bordes definidos
- Áreas de vacío de señal en secuencias T2.
- Edema perilesional.

### **3.4.1.2. TÉCNICAS AVANZADAS Y PROCESADO**

Las cuatro técnicas de RM avanzada: difusión (DWI), perfusión, tensor de la difusión (DTI) y espectroscopia multivoxel (MRS) fueron procesadas en la estación de trabajo (extended MR workspace 2.6.3.4. Philips Medical System Nederland B.V) y se limitó el estudio a tres zonas de interés definidas a continuación:

- **Área tumoral (TM):** porción sólida bien definida, con captación uniforme de contraste y alta señal en secuencias T2 y FLAIR.
- **Área peritumoral (PERITM):** región claramente delimitada de la porción sólida bien definida, sin captación de contraste y con hiperseñal en secuencias T2, FLAIR y DWI.
- **Sustancia blanca contralateral (n).** Área que no presenta realce, ni hiperseñal en secuencias T2, FLAIR ni DWI.

#### **3.4.1.2.1. DIFUSION**

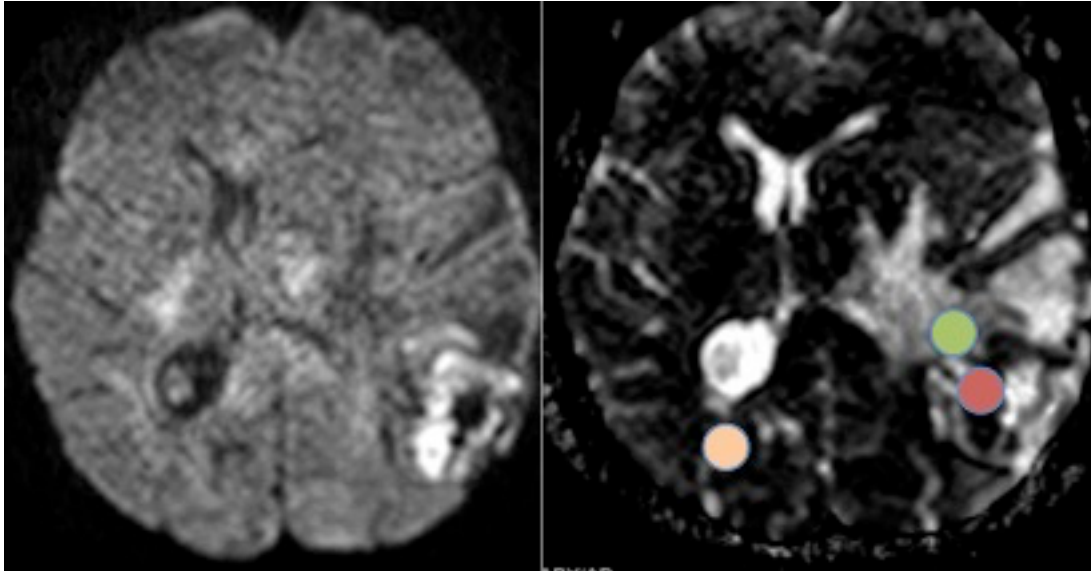
Las imágenes en DWI se obtuvieron previas a la administración del medio de contraste mediante secuencias eco-planar espin-eco con los siguientes parámetros: TE (tiempo de eco)=74 y 112 ms, TR (tiempo de repetición)= 5200 ms, adquisición en plano axial, 32 cortes con 3-mm de grosor sin intersección de gap, FOV (field of view) 23 x 23 cm, matriz de adquisición 192 x 153, 106-300 Hz/píxel, con dos valores de  $b=0$  y  $b=1000$  s/mm<sup>2</sup> y los mapas de ADC correspondientes. El tiempo de adquisición total fue de 1min y 56 segundos.

Todos los datos se analizaron en la estación de trabajo (Extended MR workspace 2.6.3.4. Philips Medical System Nederland B.V).

Los valores de ADC fueron calculados manualmente colocando ROIs en la lesión realizada (ADC TM), región peritumoral (ADC PERITM) y el parénquima normal contralateral (ADC n), guiada por imágenes T2WI e imágenes con contraste iv. Los ROIS fueron colocados cuidadosamente para evitar regiones quísticas, necróticas y hemorrágicas que pudieran influenciar los valores de ADC.

Se seleccionó un ROI de 10-15 mm<sup>2</sup> con menor valor en los mapas de ADC de la región tumoral, peritumoral y de la sustancia blanca contralateral. Los valores estándar medios de ADC fueron expresados como 10<sup>-3</sup> mm<sup>2</sup>/s.

Los valores relativos ADCr se hallaron comparando los valores con las medidas obtenidas en la sustancia blanca normal contralateral (ADCTM/ADCn, ADCPERITM/ADCn).



**FIGURA 3.2.** Ejemplo de selección de ROIS en difusión: región tumoral (círculo rojo), peritumoral (círculo verde) y sustancia blanca contralateral (círculo naranja).

### **3.4.1.2.2. TENSOR DE LA DIFUSIÓN (DTI)**

Para el DTI se usaron secuencias potenciadas en difusión con los siguientes parámetros: TR=923 ms, TE=80 ms, matriz: 128 x 128, FOV: 224 x 224 mm; grosor de 2 mm y ancho de banda de 1783 Hz por pixel.

Se realizó codificación del gradiente de difusión en seis direcciones con un valor b de 800 sec/mm<sup>2</sup> y tamaño isotropico de cada voxel de 1,9 x 1,9 x 1,9 mm. El tiempo de adquisición total fue de diez minutos. Todos los datos se analizaron en la estación de trabajo (Extended MR workspace 2.6.3.4. Philips Medical System Nederland B.V).

La imagen de la tractografía se fusionó con el 3DT1 con contraste IV y se obtuvieron valores de las regiones tumorales, peritumoral y sustancia blanca contralateral, mediante la colocación manual de ROIS en un área de 10-15 mm<sup>2</sup>.

Se tomó el valor más bajo de FA tumoral, peritumoral y en sustancia blanca contralateral y se midieron los valores de FA en las tres zonas



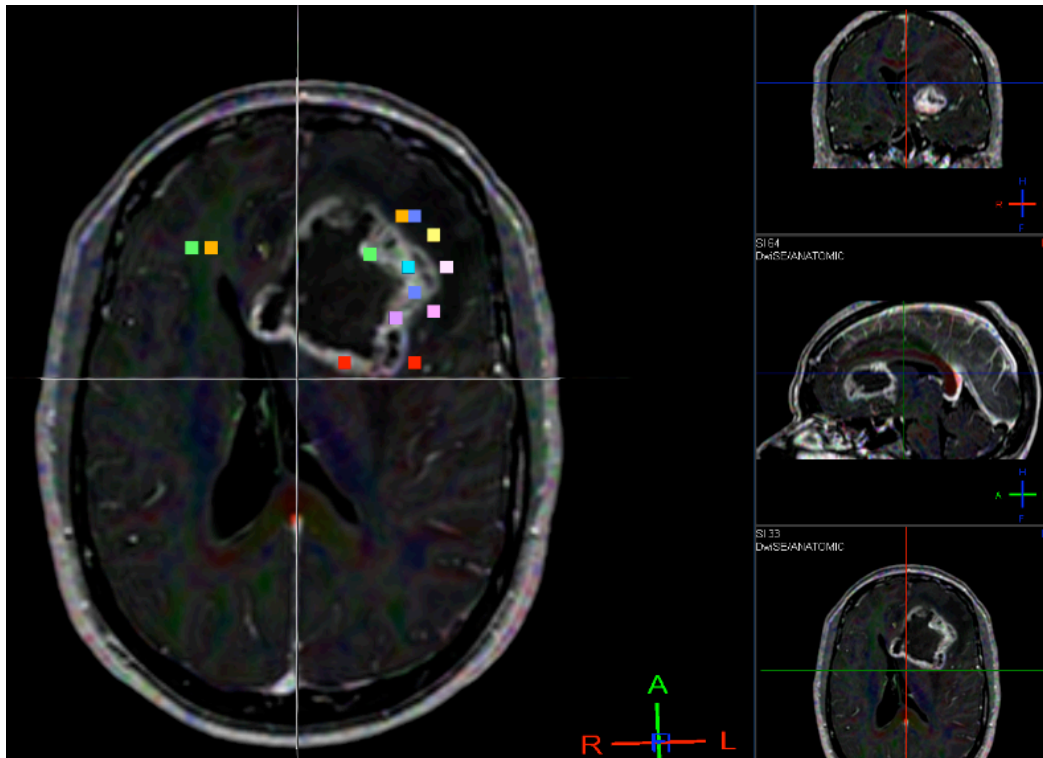


FIGURA 3.3. Ejemplo de selección de ROIS en tensor de la difusión: región tumoral, peritumoral y sustancia blanca contralateral.

**3.4.1.2.3. ESPECTROSCOPIA MULTIVOXEL**

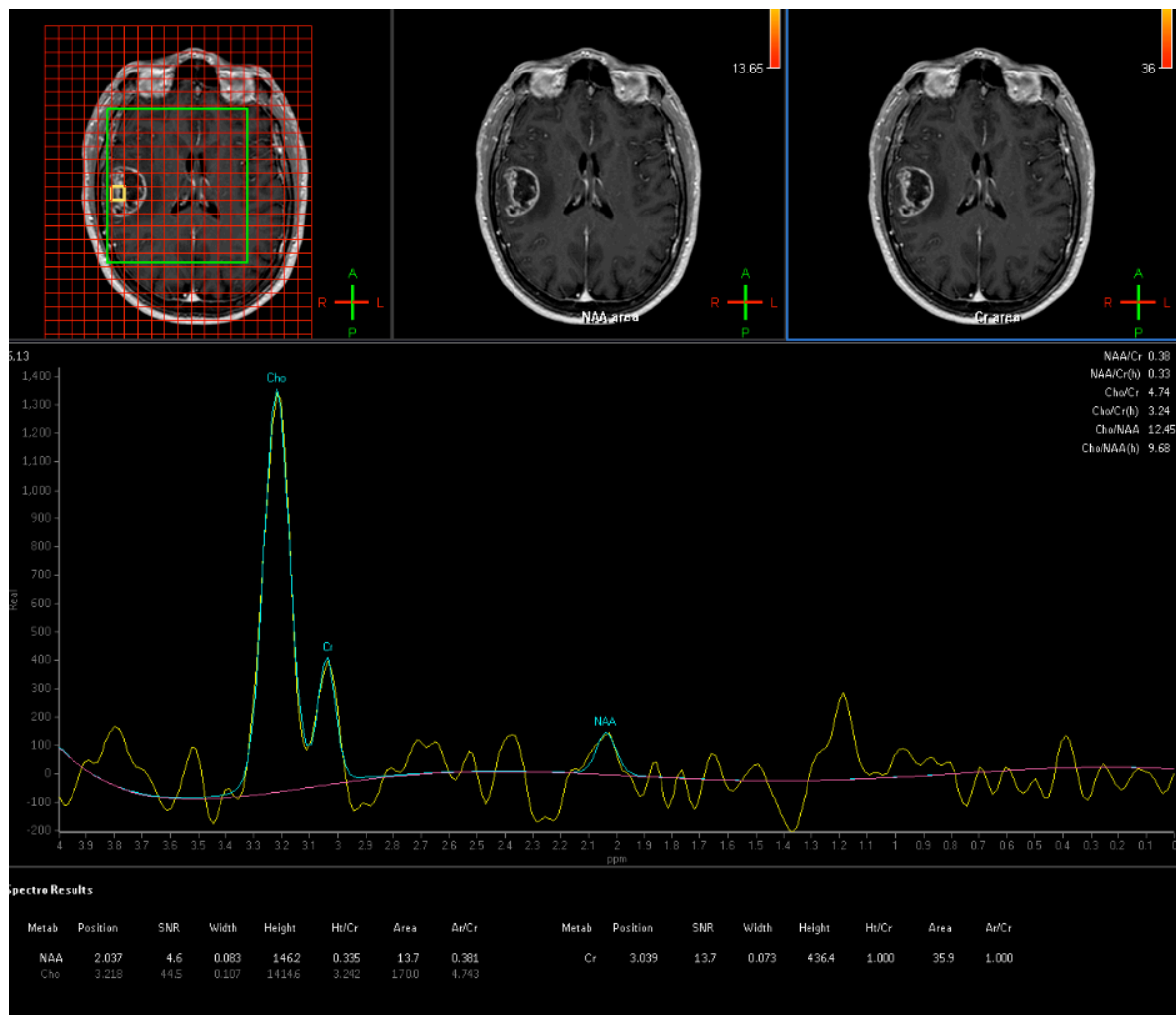
Se realizaron secuencias de MRS multivoxel (TR = 2000 ms; TE = 144 ms ; TA = 5 m, 55 seg, 1 NEX, FOV = 230 x 190 mm; tamaño nominal de cada vóxel de 1 x 1 x 1, 5 cm<sup>3</sup>). El tiempo de adquisición fue de 55 segundos.

La calidad del espectro fue evaluada mediante inspección visual y los que fueron considerados de mala calidad se excluyeron del estudio.

Para cada metabolito se seleccionó el VOI que más nos interesó estudiar.

**ESPECTRO TE LARGO, MULTI 144.** Se seleccionaron los siguientes cocientes de las zonas tumoral, peritumoral y sustancia blanca contralateral. Se evitaron zonas necróticas/quísticas y vasos.

- **NAA/CR** (el de menor valor)
- **CHO/CR** (mayor valor)
- **CHO/NAA o índice CNI** (mayor valor).



**FIGURA 3.4.** Espectroscopia TE largo. Ejemplo de selección de VOI en región tumoral.

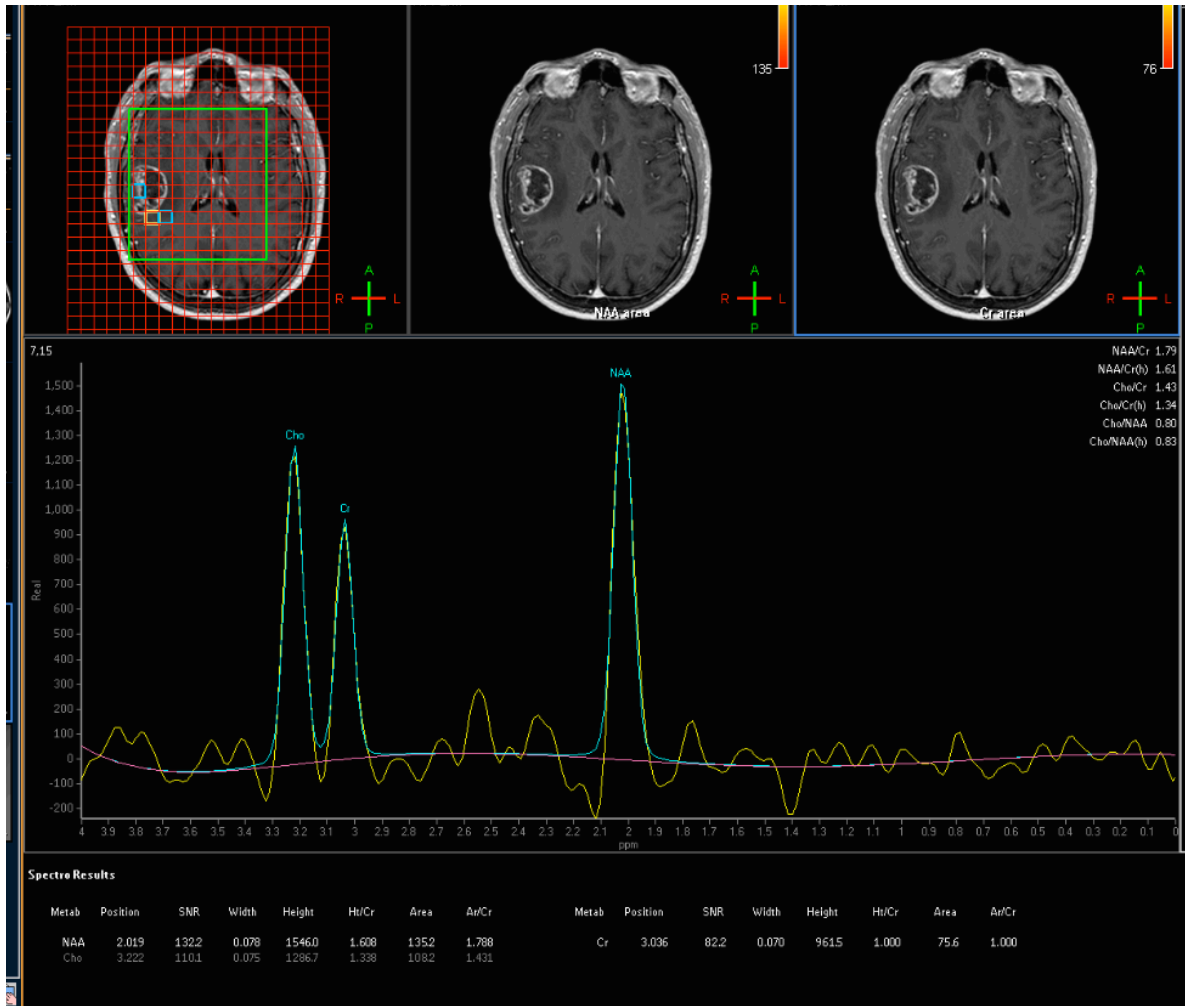
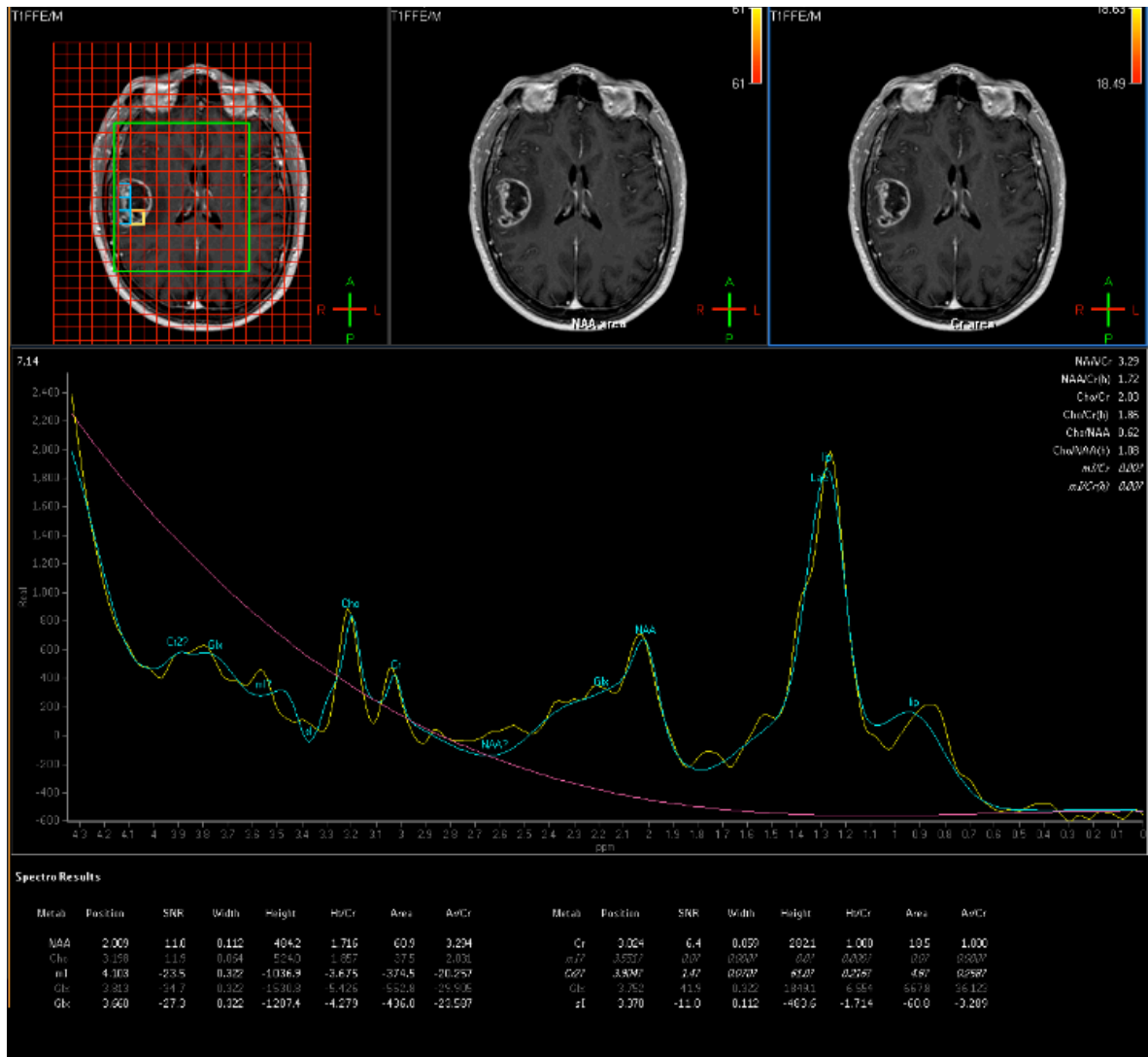


FIGURA 3.5. Espectroscopia TE largo. Ejemplo de selección de VOI en región peritumoral.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**ESPECTRO TE CORTO, MULTI 35.** Se obtuvieron los siguientes cocientes normalizados: **Nlac, Nlip 0,9 y Nlip 1,3** que se obtienen al dividir los valores absolutos de cada uno de estos metabolitos (lactato, lípidos a 0,9 y 1,3 ppm) por la mediana de la NAA de la sustancia blanca contralateral. Se seleccionaron manualmente los VOIS de mayor valor en la región tumoral y peritumoral y en los casos en los que no existía pico de lactato o de lípidos se le asignó el valor 0.



**FIGURA 3.6.** Espectroscopia TE corto. Ejemplo de selección de VOI en región tumoral.

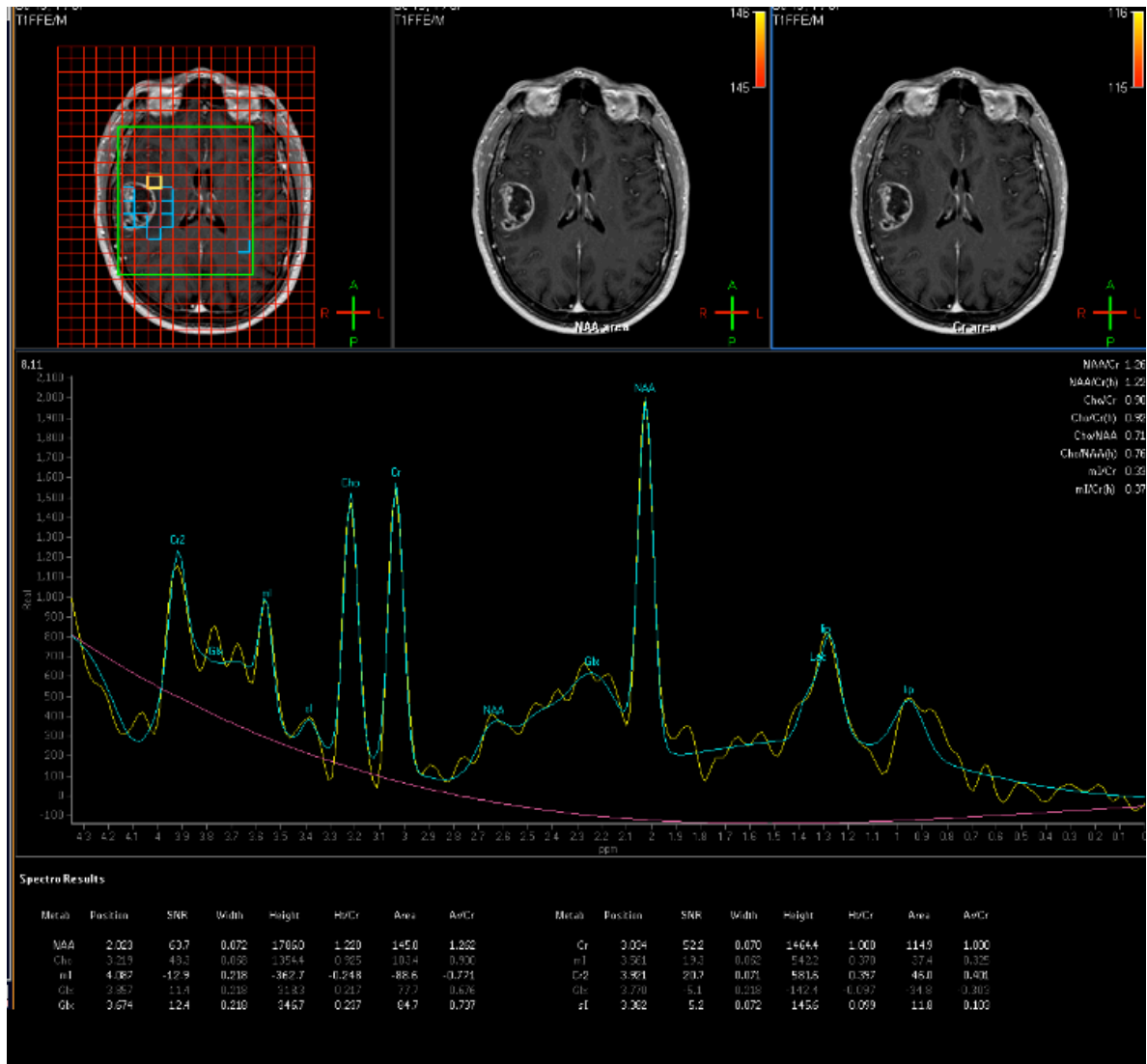


FIGURA 3.7. Espectroscopia TE corto. Ejemplo de selección de VOI en región peritumoral.

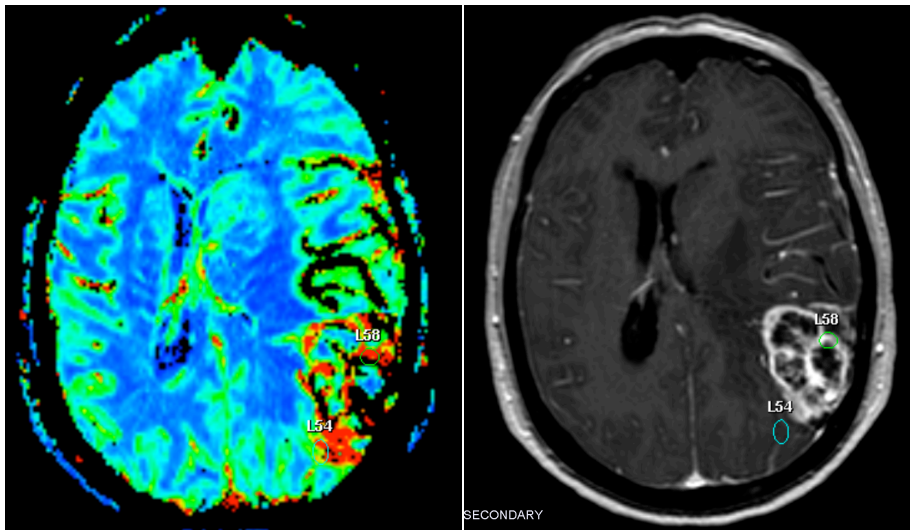
**3.4.1.2.4. PERFUSIÓN**

Para obtener las secuencias de perfusión se inyectó un bolo de contraste de gadobutrol (Gadovist) a una dosis de 0,2 mmol/Kg de peso, con una inyección a 3ml durante 7 segundos.

Las secuencias de perfusión incluyen los siguientes parámetros: TR/TE, 2050/80 ms; FOV= 30 x 30 cm<sup>2</sup> ; resolución en plano 1.72 x 1.72 x 3mm<sup>3</sup> ; 11 cortes y el tiempo de adquisición fue de 1 minuto y 10 segundos.

Las regiones de interés fueron estudiadas con la colocación manual de ROIs en un área de 10-15 mm<sup>2</sup>, en las zonas de interés tumoral y peritumoral. El valor máximo de VSC fue obtenido mediante la identificación de las regiones de máxima perfusión en los mapas de color. Los valores relativos VSCr (ml/100g) se hallaron comparando los valores con las medidas obtenidas en la sustancia blanca normal contralateral (VSCTM/VSCn, VSCPERITM/VSCn).

Se tuvo especial cuidado para no incluir vasos peritumorales o intratumorales, así como zonas necróticas y quísticas que podrían alterar los valores de perfusión.



**FIGURA 3.8.** Perfusión. Ejemplos de selección de ROI en región tumoral y peritumoral.

### **3.4.2. SEGUNDA FASE. OBTENCIÓN DE TEJIDO PERITUMORAL EN EL QUIRÓFANO**

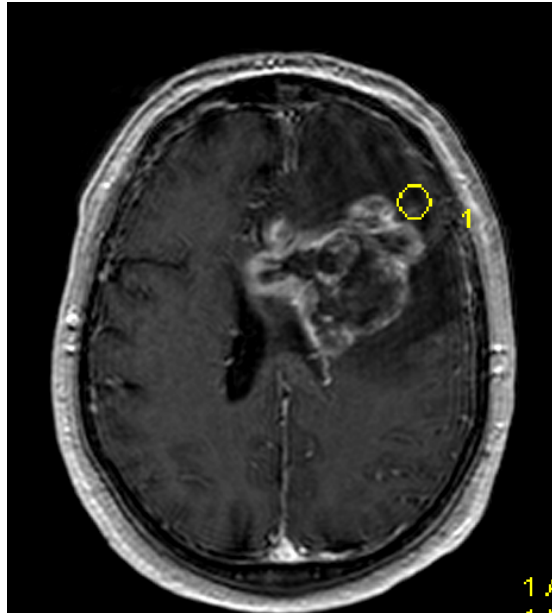
Como hemos comentado anteriormente, un neurorradiólogo experto interpretaba las imágenes de los 70 casos incluidos, tanto las secuencias de RM convencional como las de RM avanzada (difusión, tensor de la difusión, espectroscopia y perfusión) con su correspondiente post-procesado en la estación de trabajo y obtención de los valores comentados previamente. El tiempo de interpretación y de recogida de datos era de aproximadamente 90 minutos.

En los 30 casos en los que se obtuvo una muestra quirúrgica de tejido, se reunieron dos neurorradiólogos expertos que de una forma consensuada repasaron los casos y consideraron conjuntamente cuál era la zona de mayor infiltración peritumoral desde el punto de vista radiológico. El tiempo de decisión en cada caso fue de aproximadamente 30-45 minutos. La zona de interés peritumoral acordada se marcó mediante un ROI de 10-15mm<sup>2</sup> en la secuencia 3DT1 con contraste iv. Esta imagen quedaba grabada en la historia clínica del paciente. En el caso de la que la zona de mayor infiltración fuera una zona profunda o afectara a una zona elocuente, se marcaba una segunda área alternativa.

En el momento del acto quirúrgico, el radiólogo estaba presente en el quirófano y mediante el visor de rayos del quirófano accedía a la RM del paciente y a la secuencia axial 3DT1 con contraste i.v que mostraba el ROI con la zona de interés peritumoral (figura 3.9).

Mediante sistema de neuronavegación y previo a la resección tumoral, se localizaba la zona de interés y mediante la ruta anatomo-funcional más correcta y con menor riesgo para el paciente se realizaba la obtención de varias muestras. En todos los casos seleccionados las áreas seleccionadas fueron accesibles quirúrgicamente sin suponer un riesgo adicional para el paciente.

En quirófano se introducía la muestra en solución salina tamponada y estéril, y se trasladaban a Biobanco para iniciar su procesamiento, el cual detallamos a continuación.



**FIGURA 3.9.** Secuencia axial 3DT1 con contraste i.v. El ROI 1 marca el área de interés peritumoral que se seleccionó en este caso.



### **3.4.3. TERCERA FASE: PROCESADO DEL TEJIDO.**

Se procesaron muestras obtenidas durante la intervención quirúrgica, donadas y registradas en el Biobanco del IMIB. Se obtuvieron al menos tres muestras del tejido peritumoral (en la mayoría de los casos correspondiente a la región del estudio radiológico); de las que una se congeló para el estudio molecular y dos se fijaron en paraformaldehído 4% en tampón fosfato alcalino (0.1 M pH 7.4), para el histológico.

#### **3.4.3.1. ESTUDIO HISTOLÓGICO. OBTENCIÓN DE SECCIONES HISTOLOGICAS**

Las muestras de tejido dirigidas al procesamiento histológico se incluyeron en bloques de parafina después de ser fijadas en paraformaldehído al 4% en tampón fosfato salino (PBS). De cada uno de los bloques de parafina se obtuvieron secciones seriadas de 7  $\mu$ m de grosor. Las secciones se recogieron directamente en portaobjetos de vidrio en series consecutivas. Al finalizar se almacenaron en ambiente seco y frío hasta ser utilizadas para inmunohistoquímica con revelado con diaminoencidina (DAB) o inmunofluorescencia.

#### **3.4.3.2. INMUNOFLUORESCENCIA.**

Todas las diluciones preparadas de anticuerpo primario, secundario y estreptavidina-fluoróforo que se detallan a continuación se centrifugaron 5 minutos a 10000 rpm para precipitar agregados.

- **BLOQUEO:**

Tras la desparafinación en alcoholes descendentes (100-96-80-70%) se realizaron tres lavados con PBS 1x a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Se bloquearon las uniones no específicas a la vez que se permeabilizó el tejido mediante una incubación con 10% de suero de caballo y 0.25% de tritón (respectivamente) en PBS 1x durante 2 horas a temperatura ambiente.

- **ANTICUERPOS PRIMARIOS:**

Se han utilizado anticuerpos específicos para identificar los diferentes tipos celulares de interés:

- AntiNG2, para identificar pericitos
- AntiGFAP, para identificar células tumorales y astrocitos
- AntiCD31, para identificar endotelio vascular
- AntiCD44, para identificar receptores de ácido hialurónico en la célula tumoral y el pericito
- AntiCdc42, en la célula tumoral y el pericito

Los portas con las secciones se incubaron durante toda la noche con estos anticuerpos primarios en PBS 1x con 1% suero de caballo y 0.25% de tritón x100 a temperatura ambiente y atmósfera saturada de humedad para evitar las pérdidas por evaporación.

- **ANTICUERPOS SECUNDARIOS-BIOTINILADOS:**

Al día siguiente se eliminó el anticuerpo primario y se realizaron tres lavados de 10 minutos en PBS 1x con 1% suero de caballo y 0.25% de tritónx100. Seguidamente se incubaron durante dos horas con los correspondientes anticuerpos secundarios anti-especie de la que fue obtenido el anticuerpo primario en PBS 1x con 1% suero de caballo y 0.25% de tritón X100.

- **ESTREPTOVIDINA-DAB**

Incubación en el complejo avidina-biotina (kit ABC estándar, VECTOR), disuelto en PBS + Tritónx100 + en 1% suero de caballo a una concentración de 1:500, durante una hora a temperatura ambiente y oscuridad. Estas condiciones se mantuvieron en todo los casos. 2 Lavados con PBS+ Tritónx100. 2 Lavados en tampón Tris-HCl 0.05M. Reacción de revelado, mediante la incubación de los cortes en una solución de 3-3' diaminobencidina (DAB, SIGMA), diluida al 1% en tampón Tris-HCl 0.05M y peróxido de hidrógeno al 0.9%, durante un tiempo variable a temperatura ambiente y oscuridad. La reacción se para en tampón Tris-HCl 0.05M.

- **MARCAJE NUCLEAR Y MONTAJE:**

Finalizada la última incubación, se realizaron tres lavados de 10 minutos con PBS 1x. En todos los casos se realizó un último marcaje durante 5 minutos con 4',6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI. 2µg/ml de PBS 1x; Molecular Probes) que se intercala específicamente al ADN nuclear emitiendo fluorescencia azul tras iluminar la muestra con luz polarizada ultravioleta. Posteriormente se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBS y se montaron con Mowiol-NPG.

- **CONTROLES:**

En todos los casos se realizaron controles en dos portaobjetos para cada marcaje siguiendo el mismo procedimiento pero eliminando o bien el primer o el segundo anticuerpo.

### **MICROSCOPIOS.**

Las muestras histológicas se observaron mediante un microscopio de fluorescencia (Leica DM6000D; Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) y microscopio confocal (Leica DMR). Se tomaron micrografías con cámaras Leica DFC350/FX y DC500.

**3.4.3.3. ESTUDIO INMUNO-HISTOLOGICO DE LAS MUESTRAS**

El estudio histológico de las biopsias se realizó en cortes seriados de parafina a 7 micras de espesor a **28 casos de glioblastomas** de los 30 casos recogidos. En dos de ellos la muestra era tan pequeña que no permitió el diagnóstico histológico adecuado. Se realizaron al menos 5 series de cortes para explorar la expresión de diferentes marcadores.

De las tres muestras de tejido peritumoral donadas y registradas en Biobanco IMIB que se obtuvieron en quirófano y marcadas radiológicamente previamente, se obtuvo una tabla (tabla 3.1) con la siguiente clasificación.

- 0- Ninguna actividad
- 1- Poca actividad
- 2- Moderada actividad
- 3- Intensa actividad

<b>GBM</b>	<b>Infiltración vascular GFAP</b>	<b>Malformación vascular</b>	<b>Prol. Pericitos NG2</b>	<b>Infiltración inmune CD68</b>
<b>GLIO 1</b>	1	2	1	3
<b>GLIO 2</b>	1	1	1	3
<b>GLIO 3</b>	2	1	0	2
<b>GLIO 4</b>	2	1	0	2
<b>GLIO 6</b>	2	3	2	1
<b>GLIO 7</b>	2	3	3	1
<b>GLIO 8</b>	2	3	3	1
<b>GLIO 9</b>	3	3	3	0
<b>GLIO 10</b>	2	2	2	1
<b>GLIO 12</b>	1	1	1	3
<b>GLIO 13</b>	1	1	1	3
<b>GLIO 14</b>	1	1	0	2
<b>GLIO 15</b>	1	1	0	2
<b>GLIO 17</b>	2	1	2	2
<b>GLIO 18</b>	2	1	0	3
<b>GLIO 19</b>	2	2	2	2
<b>GLIO 20</b>	2	2	1	3
<b>GLIO 21</b>	1	3	2	3
<b>GLIO 22</b>	1	1	1	3
<b>GLIO 23</b>	3	3	3	0
<b>GLIO 24</b>	2	1	2	3
<b>GLIO 25</b>	2	2	2	3
<b>GLIO 26</b>	3	1	2	2
<b>GLIO 27</b>	2	3	2	1

<b>GLIO 28</b>	1	1	1	3
<b>GLIO 29</b>	1	1	1	2
<b>GLIO 31</b>	2	1	1	3
<b>GLIO 32</b>	1	2	2	2

**TABLA 3.1. Tabla de datos histológicos de los 28 casos de GBM recogidos en quirófano.**

Las biopsias compuestas mayoritariamente por tejido intratumoral han permitido realizar un estudio menos extenso de la región periférica de infiltración tumoral.

Los valores han sido determinados como procedimiento de valoración cuantitativa para cada una de las características de la infiltración tumoral y el nicho perivascular, observadas en el estudio anatomopatológico de las biopsias tumorales.

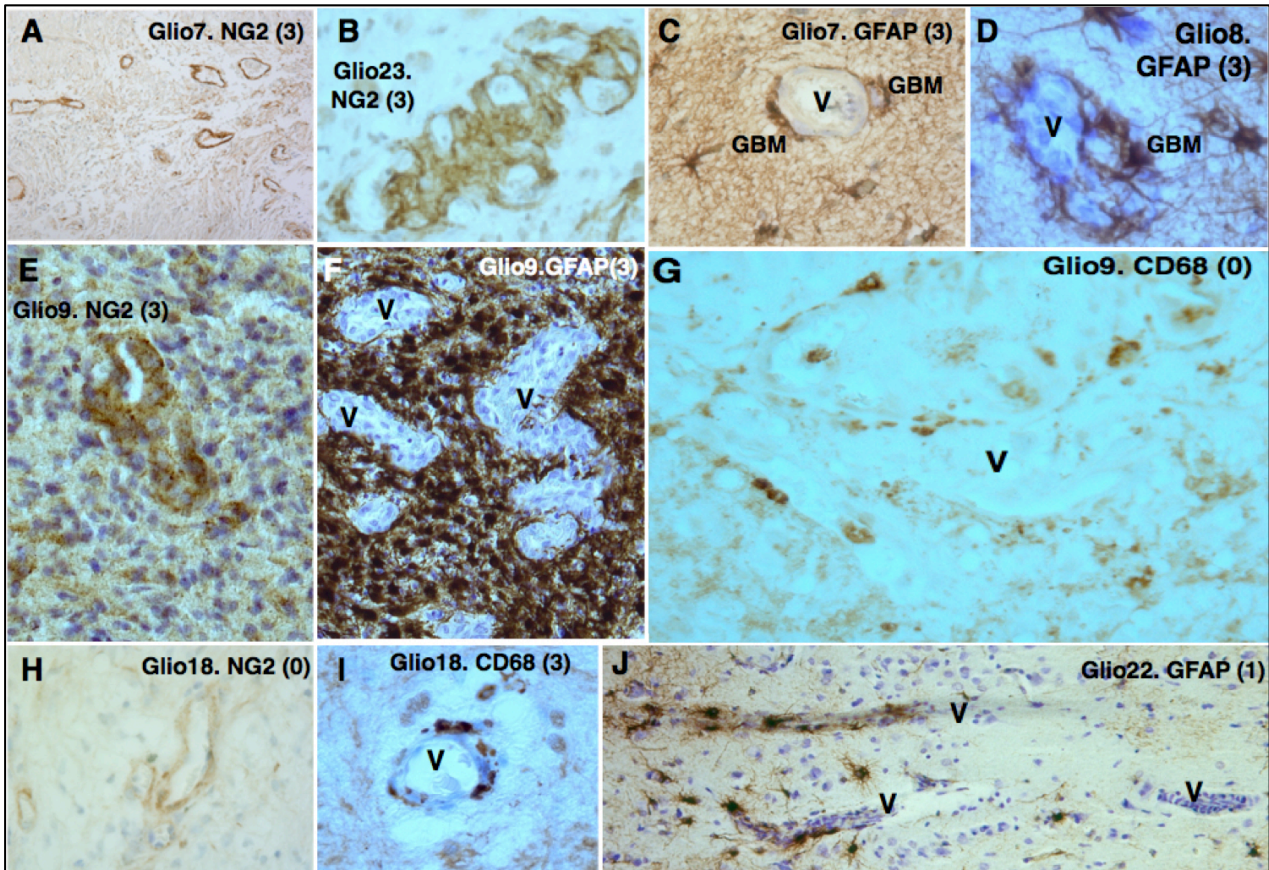
- Infiltración perivascular de células tumorales (GFAP+) en los márgenes de la masa tumoral.
- Malformación vascular (MV): vasos tortuosos con aspecto glomeruloide, que se corresponde con la definición de proliferación microvascular y/o proliferación endotelial con reducción de la luz vascular.
- Presencia de un mayor o menor número células NG2 inmunopositivas (pericitos) en la pared vascular.
- Infiltración de células con carácter macrofágico (inmunopositivas para CD68) en el parénquima peritumoral, en relación con la infiltración tumoral.

La infiltración perivascular del GBM en el margen tumoral explica la proliferación y malformación perivascular, así como el condicionamiento del sistema inmunológico debido a la interacción entre el GBM y los pericitos.

Nuestra hipótesis experimental propone que a mayor interacción entre las células tumorales y los pericitos, habrá una mayor malformación vascular, un condicionamiento inmunológico más intenso y, por lo tanto, mayor capacidad infiltrativa del tumor. Es decir, una mayor expresión de NG2 (mas pericitos) se asocia a una mayor malformación de los vasos en el margen del tumor (como consecuencia de una mayor coaptación vascular), que a su vez, irán asociados a mayor nivel de infiltración tumoral (más células GFAP positivas perivasculares); y todo ello asociado a una menor presencia de reacción inmune (células CD68). Este escenario es el que conlleva a un peor pronóstico.

**Niveles de gradación:**

Un gran número de células NG2 positivas va asociada a mayor malformación vascular e infiltración, por lo que será clasificado con Grado 3 en ambos parámetros (Figura 3.10: A-F). En estos casos aparecen muy pocas células CD68 positivas alrededor de los vasos en el frente de infiltración tumoral (Figura 3.10: G). Sin embargo, poca presencia de células NG2 positivas (grado 0; Figura 3.10: H) va asociado a niveles bajos de infiltración y niveles altos (grado 3) de presencia de células macrofágicas perivasculares, que expresan CD68 (Figura 3.10: I) y mucha menor infiltración y malformación de los vasos peritumorales (Figura 3.10: J).



**Figura 3.10.** Ejemplos representativos de la gradación histológica de las muestras de tejido peritumoral de los 28 casos de GBM.

**3.5. ESTUDIO ESTADÍSTICO**

**3.5.1. VARIABLES INCLUIDAS EN EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Toda la información obtenida de las diferentes pruebas, fue almacenada en una base de datos, para su posterior tratamiento estadístico por medio del programa informático SPSS 21.0.

Las variables analizadas fueron (tabla 3.2):

- Demográficas: edad y género.
- Radiológicas: que se subdividieron en variables de RM convencional (cualitativas) y de RM avanzada (cuantitativas continuas: difusión, perfusión, tractografía y espectroscopia).
- Histológicas peritumorales (cuantitativas discretas).

El tiempo de supervivencia global fue calculado en meses desde el diagnóstico inicial por RM hasta la fecha de muerte. El punto de corte para el análisis de supervivencia elegido fue febrero de 2018.

<b>Demográficas</b>	Edad  Género (V/M)
<b>Radiológicas</b>	
<b>RM convencional (morfológicas)</b>	Localización: derecho/izquierdo  Lóbulos: frontal, parietal, temporal, occipital, afectación de varios lóbulos o ganglios de la base.  Tamaño (diámetro máximo del tumor en los tres planos del espacio: axial, coronal y antero-posterior).  Homogeneidad/heterogeneidad en secuencias T2  Necrosis/quistes en su interior (sí/no)  Bordes definidos (sí/no)  Áreas de vacío de señal en secuencias T2 (sí/no)  Edema perilesional (sí/no)

---

<b>RM avanzada</b>	Difusión b=1000: ADCrTM, ADCrPERITM Tractografía: FArTM, FArPERITM Perfusión: VSCrTM, VSCrPERITM Espectroscopia. TE LARGO: NAA/CR, CHO/CR, CHO/NAA TM Y PERITM TE CORTO: NLAC, NLIP0.9 y NLIP1.3 TM Y PERITM
--------------------	--

**Histológicas**

**Histológicas peritumorales**

**GFAP+: Infiltración perivascular de células tumorales**

**MV: Malformación vascular**

**NG2: Proliferación de pericitos**

**CD68: Infiltración inmune de macrófagos**

---

**TABLA 3.2. Variables recogidas en el estudio.**

### **3.5.2. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA**

En primer lugar se realizó una estadística descriptiva de las variables cualitativas (demográficas y de RM convencional) con la obtención de la distribución de frecuencias y, en las variables cuantitativas se calcularon los parámetros característicos: media, desviación típica e intervalo de confianza del 95%.

### **3.5.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

- Se realizó una comparación de medias de las distintas técnicas radiológicas (perfusión, tractografía, difusión y espectroscopia) mediante el test de la t de Student para muestras relacionadas (tumorales vs peritumorales relativos).
- Se realizó un análisis de correlación de Rho de Spearman entre las cuatro variables histológicas cuantitativas (dos a dos), que fueron la infiltración perivascular de células tumorales (GFAP+), la malformación vascular, la proliferación de pericitos (NG2) y la infiltración inmune de macrófagos (CD68).
- Se realizó un análisis de correlación de Spearman entre los cuatro indicadores histológicos y los valores relativos de las técnicas de RM avanzada y la edad.
- Mediante el método Kaplan-Meier se analizaron las diferencias en supervivencia según el test de log-rank y se obtuvieron curvas de supervivencia tanto de las variables radiológicas como histológicas que fueron estadísticamente significativas. Posteriormente se realizó un análisis multivariante, según el modelo de riesgos proporcionales o regresión de Cox con el fin de identificar factores pronósticos independientes radiológicos e histológicos.
- El nivel de significación estadística se estableció en  $p < 0,05$ .





# RESULTADOS

## RESULTADOS

## 4. RESULTADOS

### 4.1. RESULTADOS DE ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

#### 4.1.1. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y MORFOLÓGICAS

Se estudiaron de forma prospectiva setenta pacientes diagnosticados de glioblastoma multiforme desde enero de 2013 a noviembre de 2015, cuyas características se resumen en la tabla 4.1. Treinta y dos pacientes eran varones (45,7 %) y treinta y ocho mujeres (54,3%). La edad media fue de  $56,6 \pm 6,7$  años.

Respecto a la lateralidad del tumor, cuarenta y seis tumores fueron derechos (65,7%) y treinta y cuatro casos fueron izquierdos (34,3%).

En cuanto a la localización tumoral, en veintiséis pacientes afectaba al lóbulo frontal (37,1%), en diez al parietal (14,3%), en dieciséis al temporal (22,9%), en dos al occipital (2,9%) y en dieciséis afectaba a más de un lóbulo o ganglios basales (22,9%).

		Edad	56,6±6,7 años	
			Pacientes (n)	Porcentaje
Sexo	Hombre		32	45,7%
	Mujer		38	54,3%
Lateralidad del tumor	Derecho		46	65,7%
	Izquierdo		34	34,3%
Localización	Frontal		26	37,1%
	Parietal		10	14,3%
	Temporal		16	22,9 %
	Occipital		2	2,9 %
	Más de 1 lóbulo o ganglios basales		16	22,9%

**TABLA 4.1. Características demográficas y morfológicas de los 70 pacientes con GBM.**

**4.1.2 CARACTERÍSTICAS DE IMAGEN EN TÉCNICAS DE RM CONVENCIONAL**

La media del tamaño en los tres planos medido en milímetros (mm) fueron los siguientes: transversal de 42,23, anteroposterior de 40,97 y craneocaudal de 42 mm.

La mayoría fueron heterogéneos (85,7%) y con áreas de vacío de señal en secuencias T2 (62,9%).

Todos presentaron edema, áreas de necrosis, efecto masa, patrón infiltrativo y realce tras el contraste iv.

<b>Característica</b>	<b>Medida o porcentaje (media)</b>		
<b>Tamaño (mm)</b>	<b>T: 42,23</b>	<b>AP: 40,97</b>	<b>CC: 42</b>
<b>Intensidad de señal en secuencias T2</b>	<b>Heterogéneos: 85,7%</b>		<b>Homogéneos: 14,3%</b>
<b>Áreas de vacío de señal en secuencias T2</b>	<b>Sí: 62,9%</b>		<b>No: 37,1%</b>
<b>Edema</b>			
<b>Áreas de necrosis</b>			
<b>Efecto masa</b>	<b>100%</b>		
<b>Patrón infiltrativo</b>			
<b>Realce tras el contraste i.v</b>			

**TABLA 4.2. Características de imagen en técnicas de RM convencional**

**4.1.3. TÉCNICAS DE RM AVANZADA.  
ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS**

- **PERFUSIÓN.** El estudio de perfusión se realizó en todos los pacientes incluidos en el estudio (n=70).
  - La media de los valores de perfusión tumoral fue  $275,91 \pm 112,20$  ml/100g.
  - La media de los valores de perfusión peritumoral fue  $92,05 \pm 44,02$  ml/100g.
  - La media de los valores de sustancia blanca contralateral fue  $36,61 \pm 6,10$  ml/100g.
  
- **DIFUSION B=1000.** El estudio de difusión b=1000 se realizó en 62 pacientes.
  - La media de los valores de ADC tumoral fue  $0,502 \pm 0,292 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ .
  - La media de los valores de ADC peritumoral fue  $0,915 \pm 0,417 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ .
  - La media de los valores de ADC en sustancia blanca contralateral fue  $0,673 \pm 0,271 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ .
  
- **TRACTOGRAFÍA.** Se realizó en 66 pacientes.  
FA
  - La media de los valores de FA tumoral fue  $0,132 \pm 0,057 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ .
  - La media de los valores de FA peritumoral fue  $0,162 \pm 0,073 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ .
  - La media de los valores de FA en sustancia blanca contralateral fue  $0,4919 \pm 0,144 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ .
  
- **ESPECTROSCOPIA TE LARGO.** Se obtuvieron los cocientes tumorales y peritumorales de CHO/NAA en 53 pacientes y los cocientes de CHO/NAA y CHO/CR TM en 56 pacientes.
  - La media de los valores de CHO/NAA tumoral fue de  $1,269 \pm 1,261$ .
  - La media de los valores de CHO/NAA peritumoral fue de  $0,610 \pm 0,617$ .
  - La media de los valores de CHO/NAA en sustancia blanca contralateral fue de  $0,591 \pm 0,402$ .
  - La media de los valores de CHO/CR tumoral fue de  $1,329 \pm 0,989$ .
  - La media de los valores de CHO/CR peritumoral fue de  $1,181$

- $\pm 0,890$ .
  - La media de los valores de CHO/CR en sustancia blanca contralateral fue de  $1,04 \pm 0,924$ .
  - La media de los valores de NAA/CR tumoral fue de  $0,750 \pm 0,736$ .
  - La media de los valores de NAA/CR peritumoral fue de  $1,471 \pm 0,817$ .
  - La media de los valores de NAA/CR en sustancia blanca contralateral fue de  $1,865 \pm 0,543$ .
- ESPECTROSCOPIA TE CORTO. Se realizaron mediciones de lactato tumoral y peritumoral en 61 pacientes, lípidos a 0.9 ppm en 62 pacientes y lip a 1.3 ppm en 63 pacientes.
    - La media de los valores normalizados de lip a 0,9 ppm TM fue  $0,496 \pm 0,496$ .
    - La media de los valores normalizados de lip a 0,9 ppm PERITM fue  $0,269 \pm 0,398$ .
    - La media de los valores normalizados de lip a 1,3 ppm TM fue  $1,529 \pm 2,782$ .
    - La media de los valores normalizados de lip a 1,3 ppm PERITM fue  $0,404 \pm 0,578$ .
    - La media de los valores normalizados de lac TM fue  $0,271 \pm 0,400$ .
    - La media de los valores normalizados de lac PERITM fue  $0,151 \pm 0,272$ .

**4.2. RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

**4.2.1. COMPARACION DE MEDIAS (CONTRASTE DE IGUALDAD DE MEDIAS) ENTRE TÉCNICAS DE RM AVANZADA.**

Se realizó una comparación de los valores medios tumorales (TM) y peritumorales (PERITM) relativos de las distintas técnicas (difusión, tractografía, perfusión y espectroscopia) mediante el test de la T Sudent en los 70 pacientes con resultados radiológicos. Todas las técnicas fueron capaces de distinguir con significación estadística el tejido tumoral del peritumoral, a excepción del cociente del espectro CHO/CR que no presentó diferencias estadísticamente significativas (**Tabla 4.3**)

	Media	E.T	t	gl	Sig.
<b>VSCrTMr-VSCrPERITMr</b>	<b>4,97</b>	<b>0,27</b>	<b>18,48</b>	<b>69</b>	<b>,000</b>
<b>ADCr TM-ADCrPERITM</b>	<b>-0,55</b>	<b>0,06</b>	<b>-9,59</b>	<b>61</b>	<b>,000</b>
<b>FArTMr-FArPERITM</b>	<b>-0,09</b>	<b>0,01</b>	<b>-6,00</b>	<b>65</b>	<b>,000</b>
<b>NAA/CR TM-NAA/CR PERITM</b>	<b>-0,66</b>	<b>0,12</b>	<b>-5,54</b>	<b>54</b>	<b>,000</b>
<b>CHO/CR TM-CHO/CR PERITM</b>	<b>-0,13</b>	<b>0,13</b>	<b>1,03</b>	<b>54</b>	<b>,308</b>
<b>CHO/NAA TM-CHO/NAA PERITM</b>	<b>0,64</b>	<b>0,16</b>	<b>4,09</b>	<b>51</b>	<b>,000</b>
<b>nLACTM/nLACPERITM</b>	<b>0,12</b>	<b>0,05</b>	<b>2,19</b>	<b>60</b>	<b>,032</b>
<b>nLIP0.9TM/nLIP0.9PERITM</b>	<b>0,23</b>	<b>0,08</b>	<b>3,01</b>	<b>61</b>	<b>,004</b>
<b>nLIP1.3TM/nLIP1.3PERITM</b>	<b>1,12</b>	<b>0,34</b>	<b>3,27</b>	<b>61</b>	<b>,002</b>

**TABLA 4.3. Contraste de igualdad de medias tumorales vs peritumorales en las técnicas de RM avanzada. E.T: error típico, t: T de Student, g.l: grados de libertad y sig: significación estadística.**

- Las medias de VSCr TM ( $7,49 \pm 2,60$ ) fueron mayores que las PERITM ( $2,52 \pm 1,11$ ) con  $P < 0,001$
- Los valores medios de ADCr TM fueron menores  $0,652 \pm 0,39$  que los PERITM  $1,19 \pm 0,57$  con  $P < 0,001$ .
- En DTI los valores medios de FAr TM  $0,253 \pm 0,104$  fueron menores que los PERITM  $0,338 \pm 0,159$  con  $P < 0,001$ .

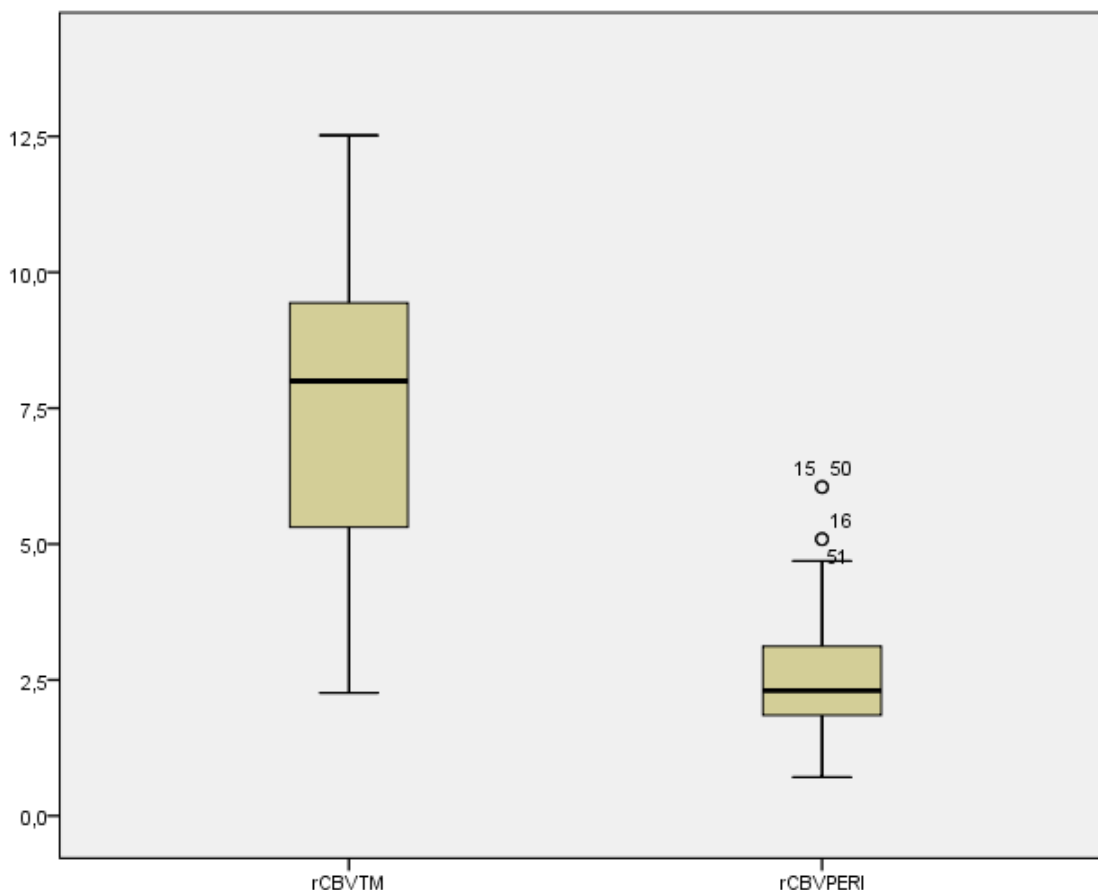


- En espectroscopia con TE largo el cociente de CHO/NAA TM ( $1,269 \pm 1,261$ ) fue mayor que el PERITM ( $0,610 \pm 0,617$ ) mientras que el de NAA/CR TM ( $0,750 \pm 0,736$ ) fue menor que el PERITM ( $1,471 \pm 0,817$ ) con  $P < 0,001$  ).
- En espectroscopia con TE corto los valores medios normalizados TM de nlip 0,9 ppm ( $0,496 \pm 0,496$ ) y de nlip 1,3 ppm ( $1,529 \pm 2,782$ ) fueron mayores que los PERITM ( $0,269 \pm 0,398$ ) y ( $0,404 \pm 0,578$ ) respectivamente con  $p < 0,05$  (**figura 5**). Los valores medios normalizados de nlac TM ( $0,271 \pm 0,151$ ) fueron mas altos que los PERITM ( $0,1518 \pm 0,272$ ) con  $p < 0,05$ .

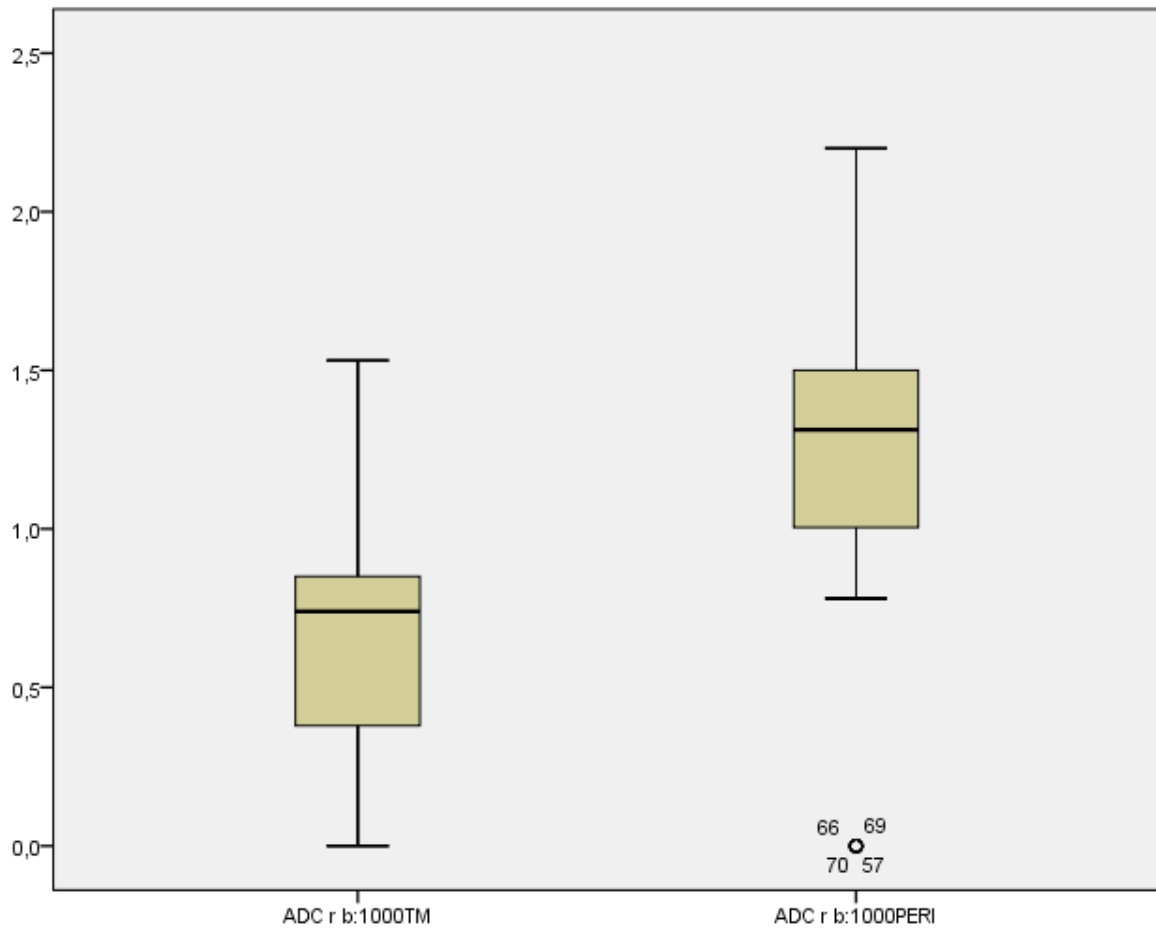
**4.2.1.1. DIAGRAMAS DE CAJAS.**

Representamos en diagramas de cajas los valores tumorales y peritumorales relativos en cada una de las técnicas.

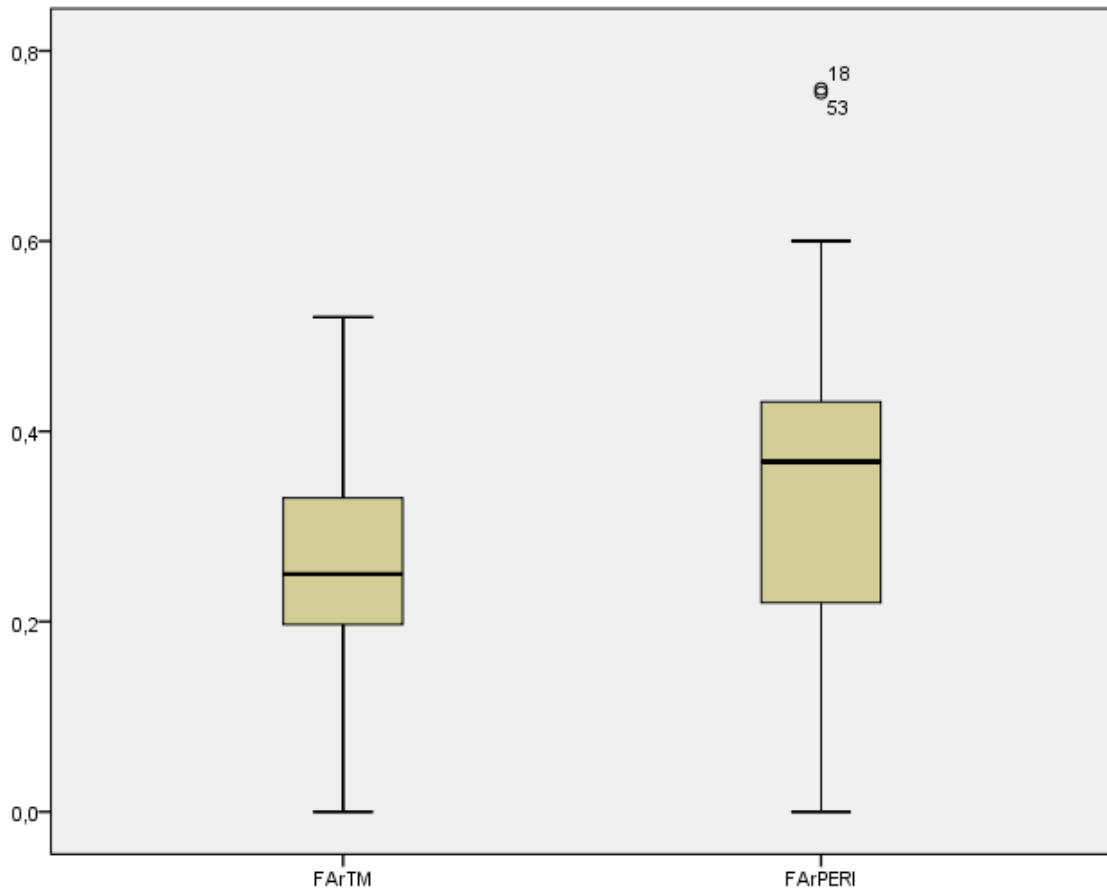
Las cajas representan el rango intercuartílico y la línea horizontal representa la mediana. Los puntos por encima de los márgenes son valores extremos que no se han excluido del análisis estadístico.



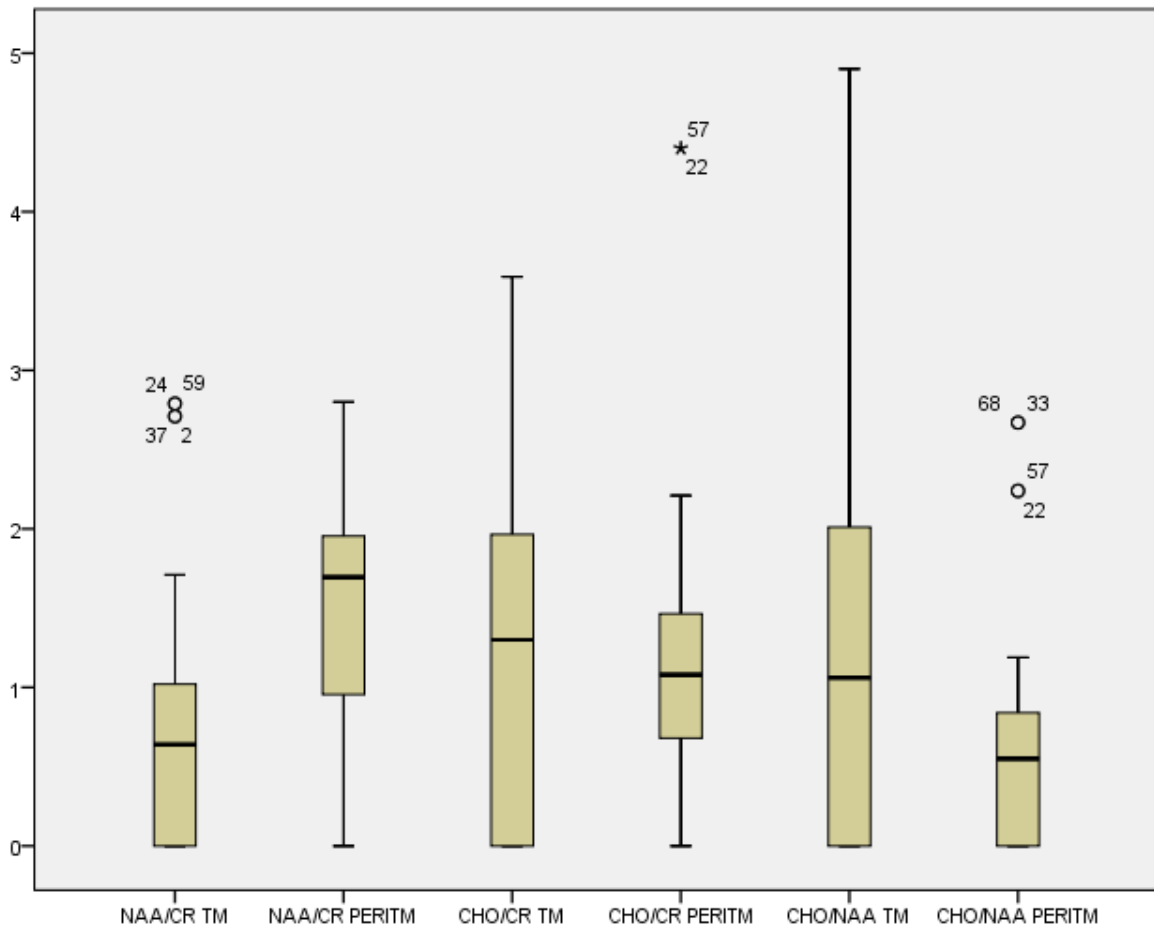
**FIGURA 4.1. Diagramas de cajas de la perfusión: VSCrTM y VSCr PERITM**



**FIGURA 4.2. Diagramas de cajas de Difusión b=1000: ADCrTM y ADCrPERITM**



**FIGURA 4.3. Diagramas de cajas de la tractografía: FAR TM y FAR PERITM.**



**FIGURA 4.4. Diagramas de cajas del espectro TELARGO: NAA/CR y CHO/NAA, CHO/CR TM Y PERITM.**

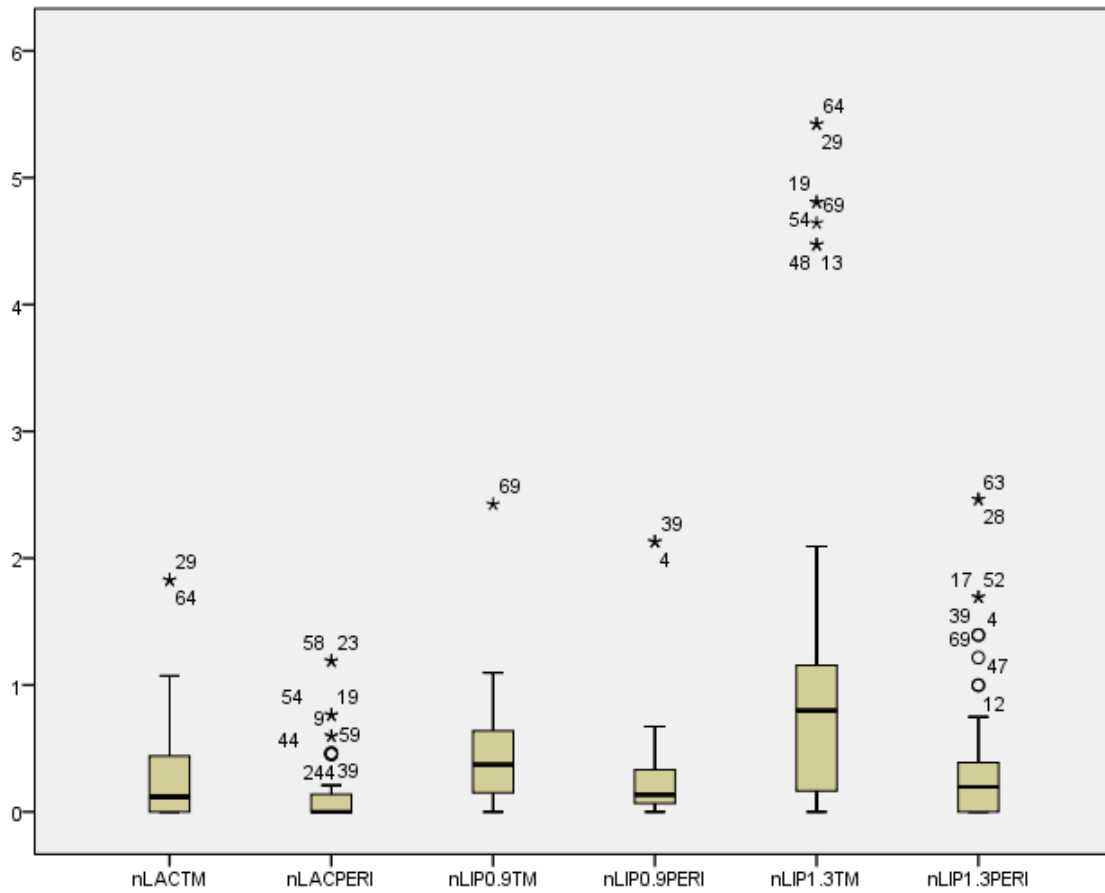


FIGURA 4.5. Diagramas de cajas del espectro TCORTO: NLAC, NLIP0.9 ppm Y NLIP1.3 ppm TM Y PERITM.

**4.2.2. ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ENTRE VARIABLES HISTOLÓGICAS**

Se realizó un análisis de correlación de Rho de Spearman entre las cuatro variables cuantitativas (dos a dos) en los 28 pacientes con resección de tejido peritumoral. Todas las correlaciones fueron significativas. El signo fue el esperado, positivo entre las tres primeras (infiltración vascular GFAP, malformación vascular y proliferación de pericitos NG2) y negativo entre éstas y la cuarta (infiltración inmune CD68). Tabla 4.4.

Variables	Coefficiente de correlación	Valor p
<b>GFAP vs MV</b>	<b>0,363</b>	<b>0,05</b>
<b>GFAP vs NG2</b>	<b>0,509</b>	<b>0,006</b>
<b>GFAP vs CD68</b>	<b>-0,528</b>	<b>0,04</b>
<b>MV vs NG2</b>	<b>0,749</b>	<b>0,0001</b>
<b>MV vs CD68</b>	<b>-0,548</b>	<b>0,03</b>
<b>NG2 vs CD68</b>	<b>-0,528</b>	<b>0,04</b>

**TABLA 4.4. Correlación de Spearman para los datos histológicos**

**4.2.3. ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ENTRE VARIABLES HISTOLÓGICAS, RADIOLÓGICAS Y LA EDAD**

Se realizó un análisis de correlación de Spearman entre éstos cuatro indicadores y los valores relativos de las técnicas de RM avanzada y la edad. La muestra incluyó a los 28 pacientes que tenían tanto datos radiológicos como histológicos.

GFAP. Se correlacionó negativamente con los valores relativos de ADC bajo tumoral y peritumoral con una significación de 0,05.

También se observó una correlación positiva con la edad  $p < 0,05$ .

MV. Se correlacionó positivamente con los valores relativos de perfusión tumoral ( $p < 0,05$ ).

Se correlacionó positivamente con los valores de CHO/CR peritumoral con  $p < 0,05$ .

NG2. Se correlacionó positivamente con los valores relativos de perfusión tumoral ( $p = 0,05$ ). Se correlación negativamente con los valores de valores normalizados de lípidos peritumorales 1.3 ppm ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS

CD68. Se correlacionó negativamente con los valores relativos de perfusión tumoral ( $p < 0,05$ ).

Se correlacionó negativamente con los valores de CHO/NAA peritumoral ( $p = 0,05$ ).

Variables	Coefficiente de correlación	Valor de p
<b>GFAP vs edad</b>	<b>0,416</b>	<b>0,02</b>
<b>GFAP vs ADCrTM</b>	<b>-0,553</b>	<b>0,05</b>
<b>GFAP vs ADCrPERITM</b>	<b>-0,350</b>	<b>0,05</b>
GFAP vs FArTM	-0,220	0,92
GFAP vs FArPERITM	0,220	0,27
GFAP vs VSCrTM	0,293	0,13
GFAP vs VSCrPERITM	0,285	0,14
GFAP vs NAA/CR TM	0,182	0,47
GFAP vs NAA/CR PERITM	0,393	0,07
GFAP vs CHO/CR TM	0,118	0,64
GFAP vs CHO/CR PERITM	-0,093	0,68
GFAP vs CHO/NAA TM	0,00	1,00
GFAP vs CHO/NAA PERITM	0,469	0,08
GFAP vs NLAC TM	0,543	0,07
GFAP vs NLACPERITM	0,291	0,17
GFAP vs NLIP0.9 TM	-0,097	0,66
GFAP vs NLIP0.9 PERITM	-0,090	0,96
GFAP vs NLIP1.3 TM	0,040	0,84
GFAP vs NLIP1.3 PERITM	0,46	0,83
MV vs edad	0,171	0,36
MV vs ADCrTM	0,070	0,73
MV vs ADCrPERITM	0,111	0,61
MV vs FArTM	-0,043	0,83
MV vs FArPERITM	0,249	0,22
MV vs VSCrTM	0,380	0,04
MV vs VSCrPERITM	0,182	0,35
MV vs NAA/CR TM	0,182	0,47
MV vs NAA/CR PERITM	-0,144	0,53
MV vs CHO/CR TM	0,118	0,64
MV vs CHO/CR PERITM	<b>0,380</b>	<b>0,04</b>
MV vs CHO/NAA TM	0,067	0,81
MV vs CHO/NAA PERITM	0,469	0,08
MV vs NLAC TM	0,142	0,51
MV vs NLACPERITM	-0,094	0,669
MV vs NLIP0.9 TM	-0,031	0,88
MV vs NLIP0.9 PERITM	-0,970	0,65
MV vs NLIP1.3 TM	0,154	0,48
MV vs NLIP1.3 PERITM	-0,235	0,27
NG2 vs edad	0,173	0,36

**RESULTADOS**

NG2 vs ADCrTM	-0,133	0,53
NG2 vs ADCrPERITM	0,132	0,54
NG2 vs FArTM	0,118	0,56
NG2 vs FArPERITM	-0,089	0,66
NG2 vs VSCrTM	<b>0,317</b>	<b>0,05</b>
NG2 vs VSCrPERITM	0,100	0,52
NG2 vs NAA/CR TM	-0,325	0,18
NG2 vs NAA/CR PERITM	-0,121	0,60
NG2 vs CHO/CR TM	0,095	0,70
NG2 vs CHO/CR PERITM	0,343	0,12
NG2 vs CHO/NAA TM	0,067	0,81
NG2 vs CHO/NAA PERITM	0,287	0,24
NG2 vs NLAC TM	0,172	0,43
NG2 vs NLACPERITM	-0,021	0,92
NG2 vs NLIP0.9 TM	-0,249	0,252
NG2 vs NLIP0.9 PERITM	-0,333	0,12
NG2 vs NLIP1.3 TM	-0,041	0,85
NG2 vs NLIP1.3PERITM	<b>-0,440</b>	<b>0,03</b>
CD68 vs edad	- 0,171	0,36
CD68 vs ADCrTM	0,182	0,39
CD68 vs ADCrPERITM	0,032	0,99
CD68 vs FArTM	0,118	0,56
CD68 vs FArPERITM	-0,089	0,66
CD68 vs VSCrTM	<b>-0,534</b>	<b>0,04</b>
CD68 vs VSCrPERITM	-0,257	0,18
CD68 vs NAA/CR TM	0,155	0,539
CD68 vs NAA/CR PERITM	-0,132	0,56
CD68 vs CHO/CR TM	0,488	0,07
CD68 vs CHO/CR PERITM	-0,138	0,55
CD68 vs CHO/NAA TM	0,210	0,45
CD68 vs CHO/NAA PERITM	<b>-0,396</b>	<b>0,05</b>
CD68 vs NLAC TM	-0,147	0,50
CD68 vs NLACPERITM	0,141	0,52
CD68 vs NLIP0.9 TM	0,034	0,89
CD68 vs NLIP0.9 PERITM	0,014	0,94
CD68 vs NLIP1.3 TM	0,038	0,86
CD68 vs NLIP1.3PERITM	0,104	0,63

**TABLA 4.5. Correlación de Spearman para los datos histológicos, radiológicos y la edad.**



### **4.2.4. SUPERVIVENCIA DE LOS TUMORES**

#### **4.2.4.1. ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL DE LOS PACIENTES**

Se obtuvieron las supervivencias en meses de todos los pacientes recogidos en el estudio con fecha de cierre del estudio en febrero de 2018.

El período de seguimiento incluyó los meses transcurridos desde la fecha inicial del estudio de RM hasta la fecha de la muerte y el período de seguimiento mínimo fue de 27 meses.

La influencia pronóstica de cada una de las variables en términos de supervivencia global se evaluó en análisis univariados y multivariados.

La supervivencia total se valoró según el método de Kaplan-Meier, con un intervalo de confianza al 95%.

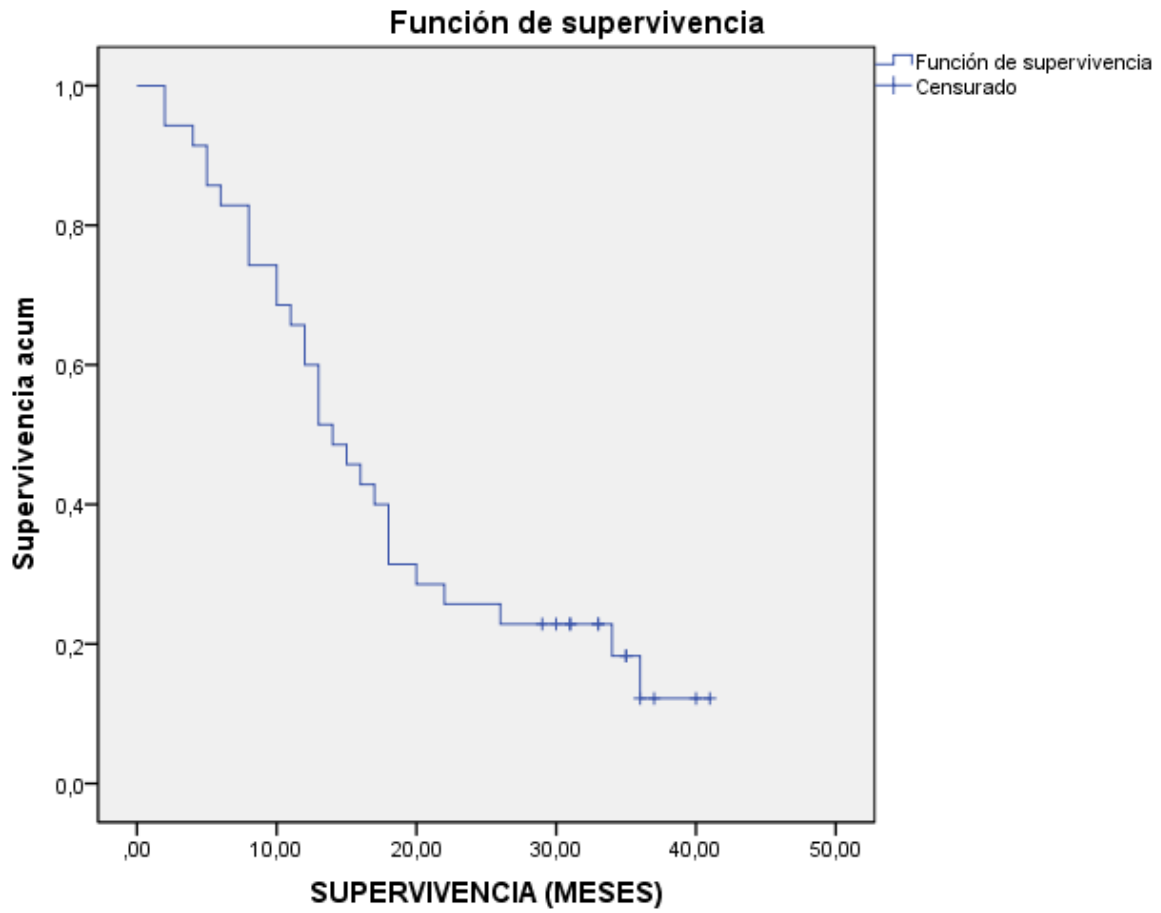
Se dicotomizaron algunas variables con el fin de facilitar y optimizar el análisis estadístico. Tanto la edad como las variables radiológicas tumorales y peritumorales se categorizaron según la mediana.

Se realizaron dos análisis de supervivencia, uno para los 70 pacientes incluidos en el estudio radiológico y otros para los 28 pacientes que tenían además del estudio radiológico el estudio histológico de la pieza quirúrgica.

De los 70 pacientes con tumoración glial de alto grado, 12 pacientes seguían vivos en febrero de 2018, no obstante se consideró como supervivencia la que mostraban hasta esa fecha. Estos 12 pacientes se consideraron censurados ya que el tiempo de seguimiento se completó antes de que ocurriera la muerte. No obstante se han incluido todos los pacientes en el estudio, ya que se asume un supuesto básico en el análisis de la supervivencia y es que los no censurados representan bien a los censurados.

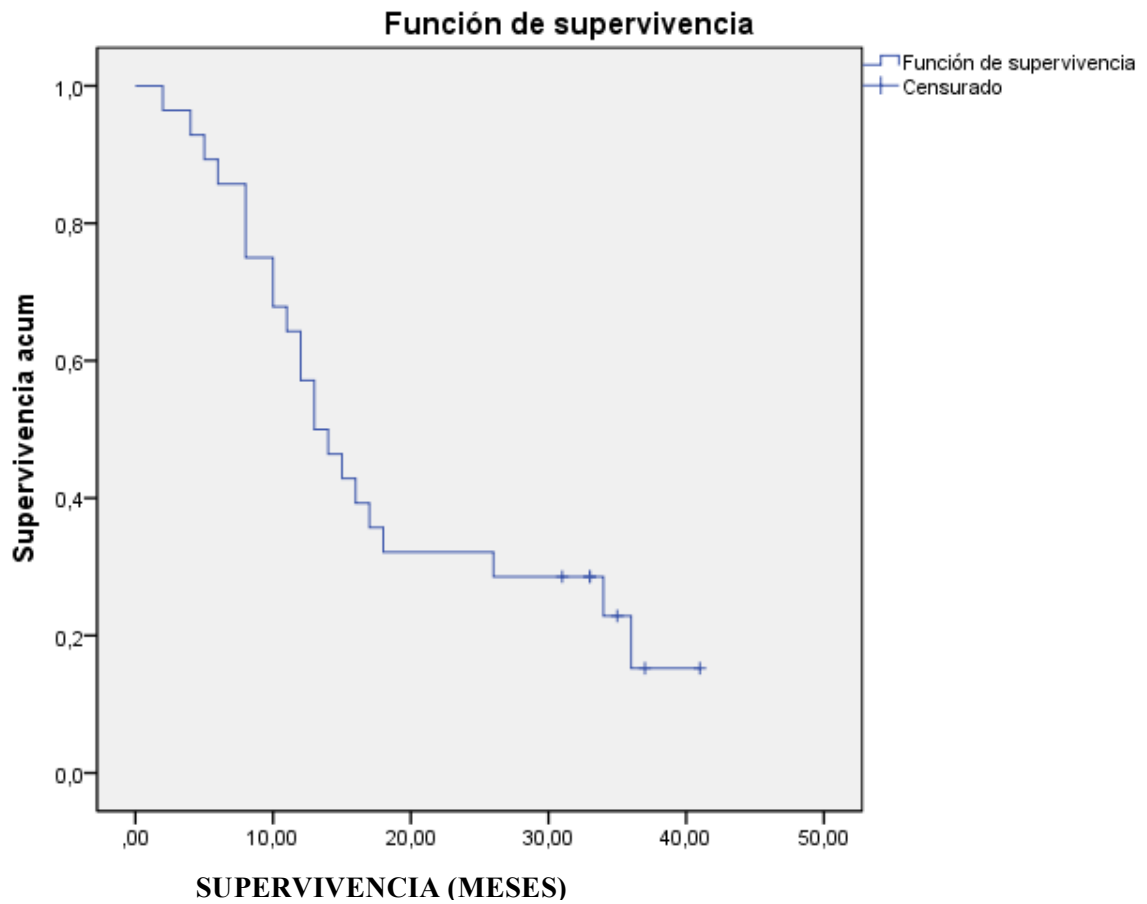
El segundo análisis de supervivencia se realizó para los 28 pacientes en los que a parte del estudio radiológico también se les realizó estudio histológico del tejido peritumoral, de los cuales 6 pacientes estaban censurados al cierre del estudio, ya que seguían vivos.

La media de supervivencia de los 70 pacientes fue  $18,06 \pm 11,15$  meses (media  $\pm$  desviación típica). La mediana o percentil 50 fue 14 meses, mientras que los percentiles 25 y 75 fueron 8 y 26 meses respectivamente. Se ha representado en la figura de Kaplan Meier (**figura 4.6**).



**FIGURA 4.6.** Curva de Kaplan Meier de los 70 pacientes con glioblastoma multiforme y estudio radiológico.

La media de supervivencia de los 28 pacientes fue de  $18,14 \pm 11,91$  (media  $\pm$  desviación típica ). La mediana o percentil 50 fue 13,5, y los percentiles 25 y 75, 8,5 y 32,5 meses, respectivamente. Se ha representado en la figura de Kaplan Meier. **Figura 4.7**



**FIGURA 4.7. Curva Kaplan Meier de los 28 pacientes con glioblastoma multiforme con estudio radiológico e histológico**

**4.2.4.1. ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA DE LOS DATOS RADIOLÓGICOS**

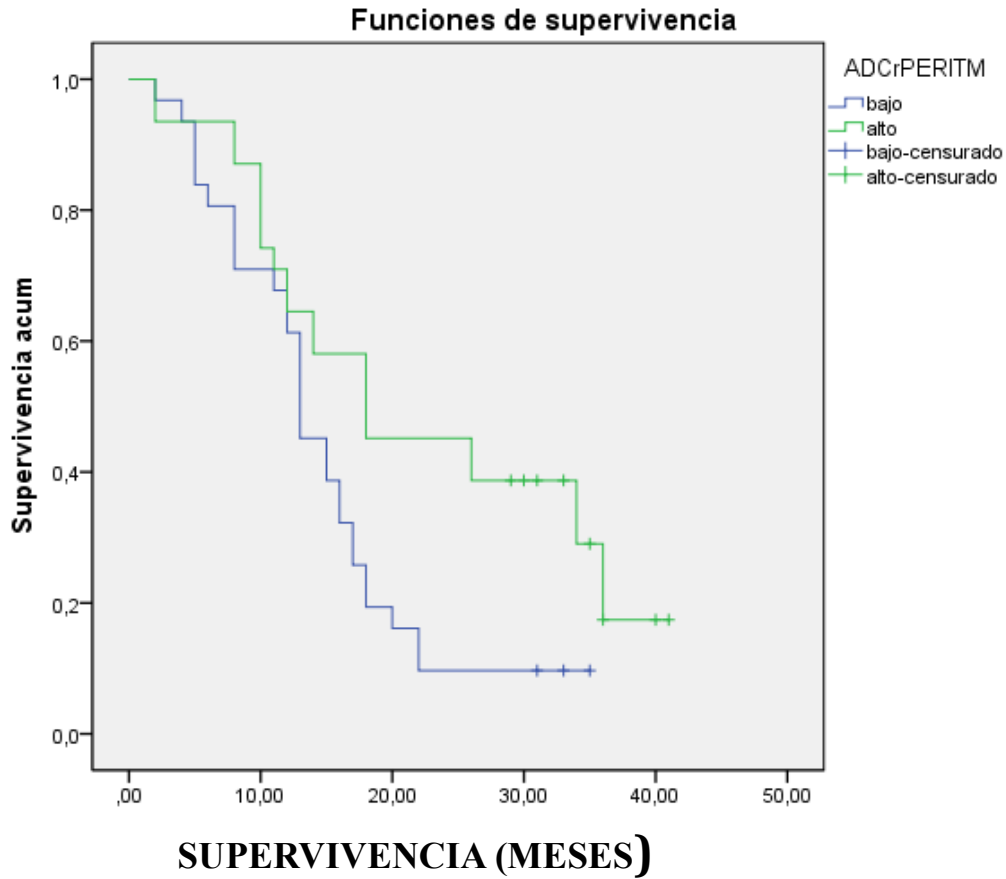
Mediante el método Kaplan-Meier se analizaron las variables radiológicas relativas tumorales y peritumorales, así como la edad, categorizadas por la mediana. Se representaron en curvas de supervivencia las variables que fueron estadísticamente significativas.

<b>Variables categorizadas</b>	<b>P de log-Rank</b>	<b>Valor de la mediana</b>	<b>n</b>
ADCrTM	0,813	0,73	62
<b>ADCrPERITM</b>	<b>0,01</b>	<b>1,31</b>	<b>62</b>
VScrTM	0,582	8,00	70
VScrPERITM	0,441	2,30	70
FArTM	0,642	0,25	66
FArPERITM	0,798	0,36	66
NAA/CR TM	0,635	0,66	56
NAA/CR PERITM	0,679	1,75	56
CHO/CR TM	0,983	1,34	56
CHO/CR PERITM	0,374	1,08	59
CHO/NAA TM	0,943	1,06	53
CHO/NAA PERITM	0,860	0,55	56
NLACTM	0,377	0,11	61
NLACPERITM	0,571	0,00	61
NLIP0.9 TM	0,647	0,37	62
NLIP 0.9PERITM	0,780	0,13	62
NLIP 1.3 TM	0,125	0,79	62
NLIP 1.3 PERITM	0,899	0,19	62
<b>EDAD</b>	<b>0,0001</b>	<b>64</b>	<b>70</b>

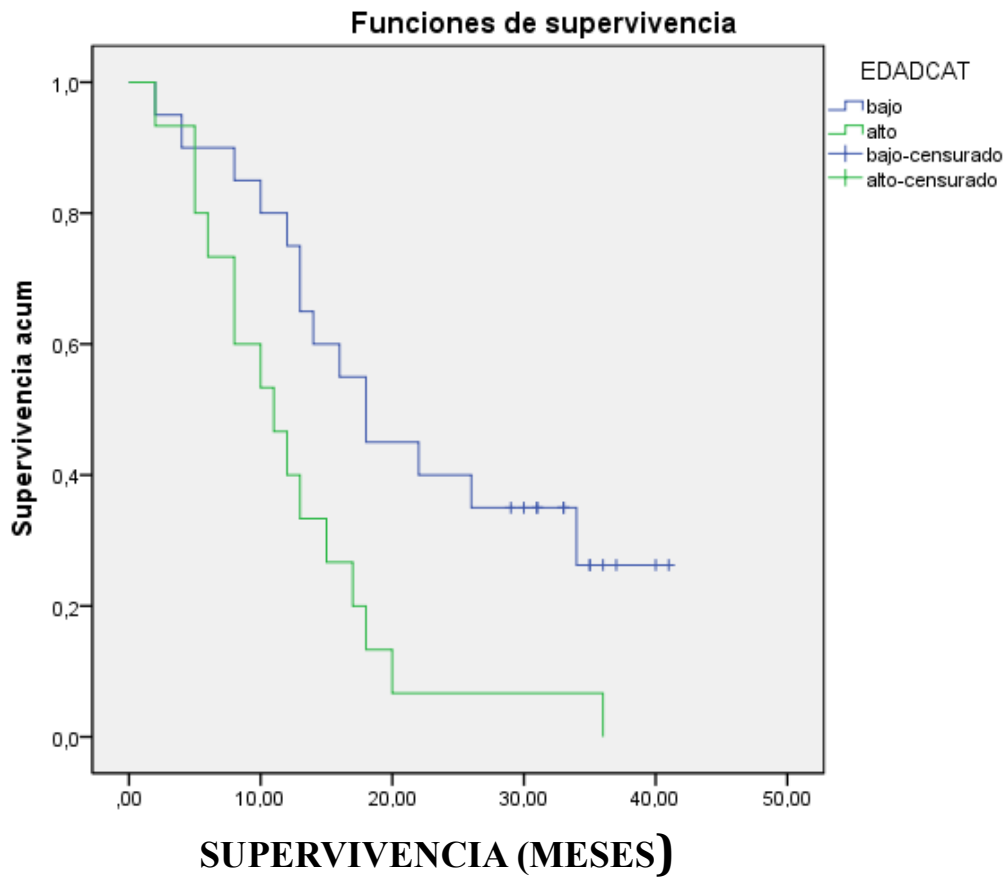
**TABLA 4.6. Análisis de la supervivencia global en relación con las variables radiológicas tumorales y peritumorales categorizadas por la mediana.**

El ADCr PERITM fue la única variable categorizada que resultó estadísticamente significativa en relación con la supervivencia global y se ha representado en la **figura 4.8**.

El resto de variables radiológicas no fueron estadísticamente significativas en el análisis de supervivencia.



**FIGURA 4.8.** Curvas de Kaplan Meier de los pacientes de GBM según la variable ADCrPERITM categorizada (mediana 1,31).



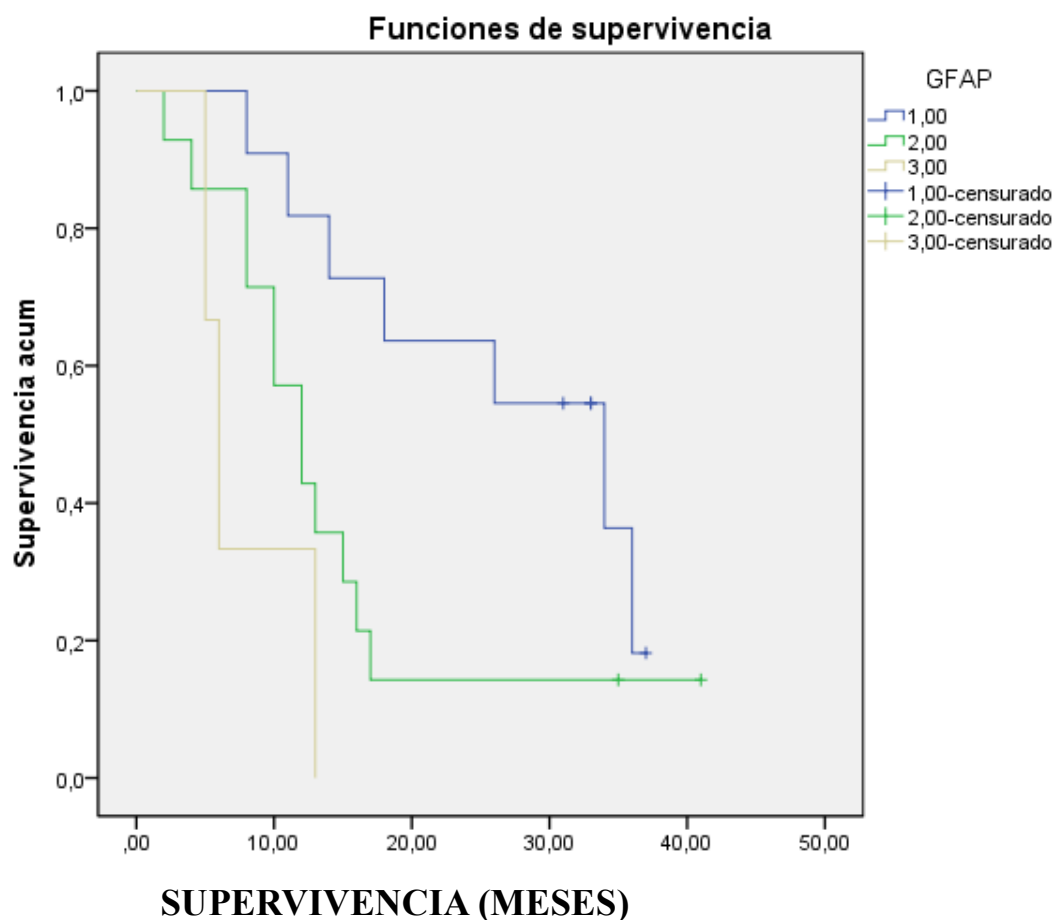
**FIGURA 4.9.** Curvas de Kaplan Meier de los pacientes de GBM según la variable edad categorizada, mediana de edad: 64 años. P de log Rank: 0,0001

**4.2.4.2. ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA DE LOS DATOS HISTOLÓGICOS.**

Mediante el método Kaplan-Meier se analizaron los 28 casos con datos histológicos y se obtuvieron las diferencias en supervivencia según el test de log-rank. Se representaron en curvas de supervivencia las variables histológicas que fueron estadísticamente significativas.

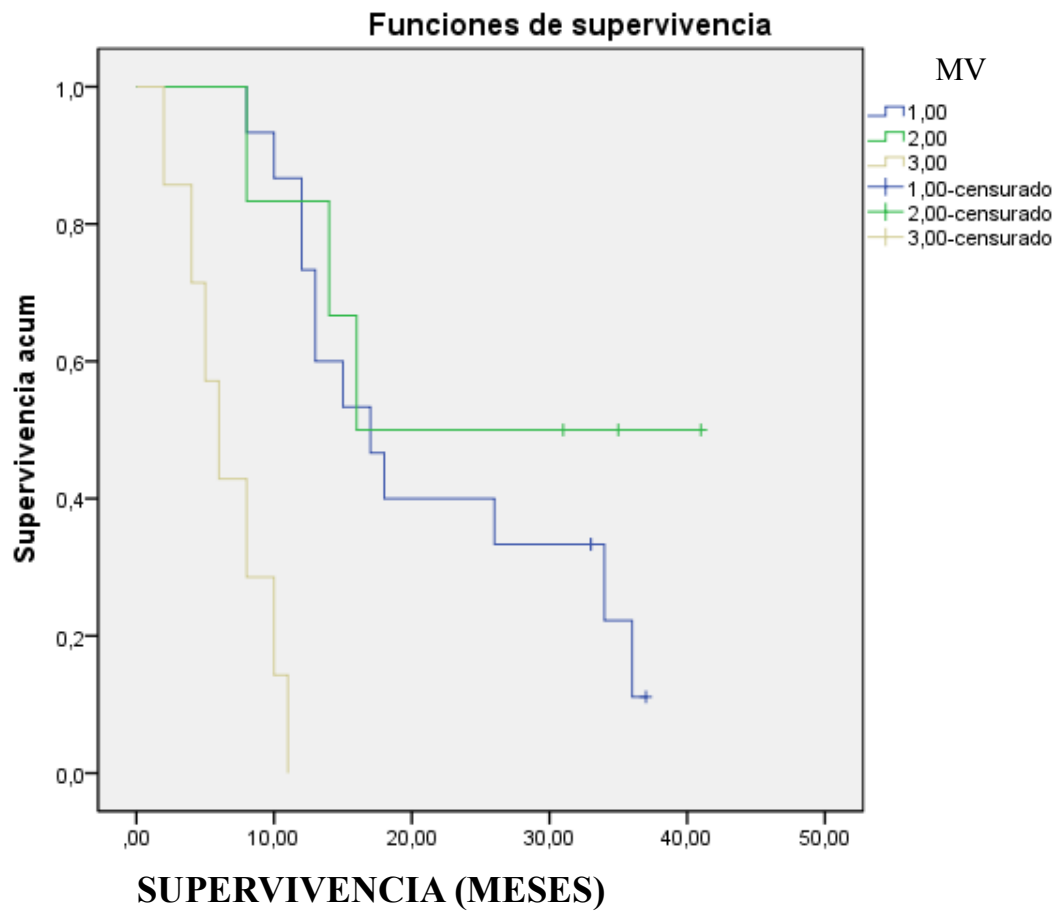
Variable histológica vs SV	P (log-Rank)	n
<b>GFAP</b>	<b>0,013</b>	<b>28</b>
<b>MV</b>	<b>0,0001</b>	<b>28</b>
<b>NG2</b>	<b>0,0001</b>	<b>28</b>
<b>CD68</b>	<b>0,02</b>	<b>28</b>

**GFAP, p Log-Rank=0,013**



**FIGURA 4.10. Curvas de Kaplan Meier de los pacientes con GBM según la variable GFAP categorizada, P de log Rank: 0,013.**

MV p Log-Rank=0,0001



**FIGURA 4.11.** Curvas de Kaplan-Meier según la variable malformación vascular categorizada, P de log Rank: 0,0001.



NG2. p Log-Rank=0,0001

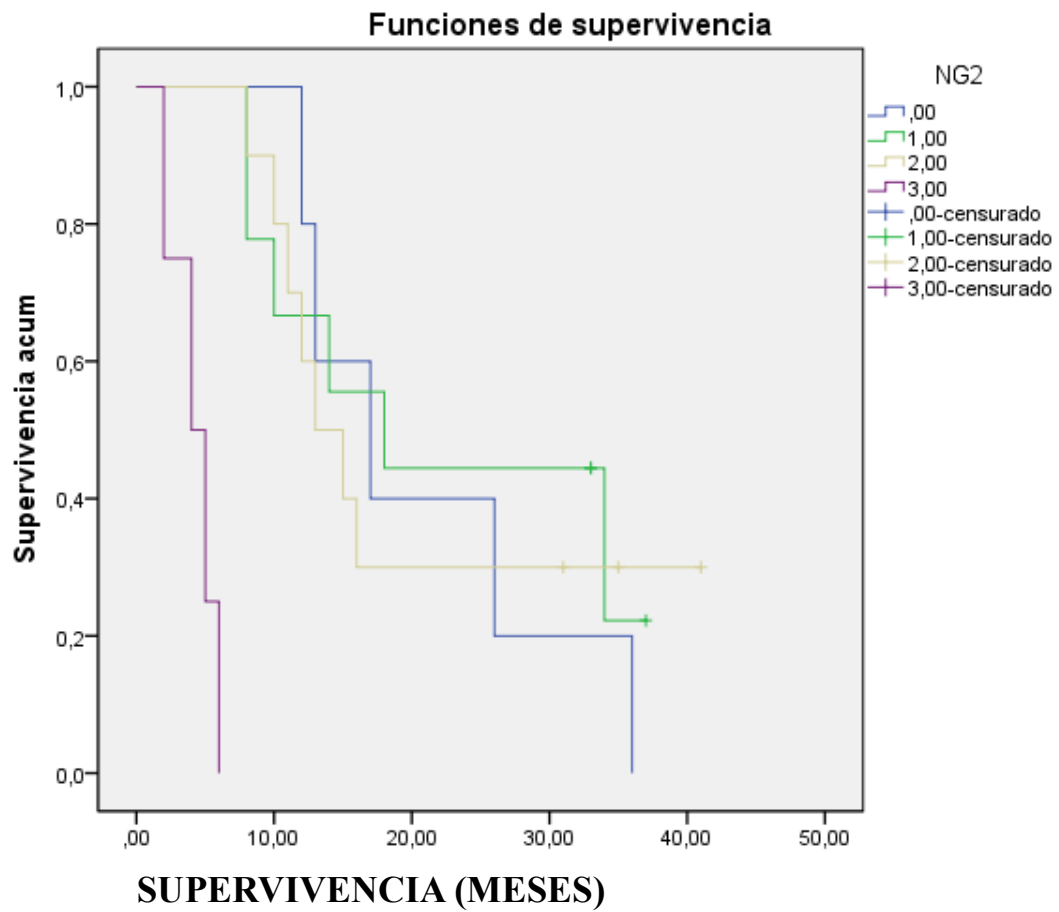


FIGURA 4.12. Curvas de Kaplan-Meier según la variable NG2 categorizada, P de log Rank: 0,0001.

CD68. p Log-Rank=0,002

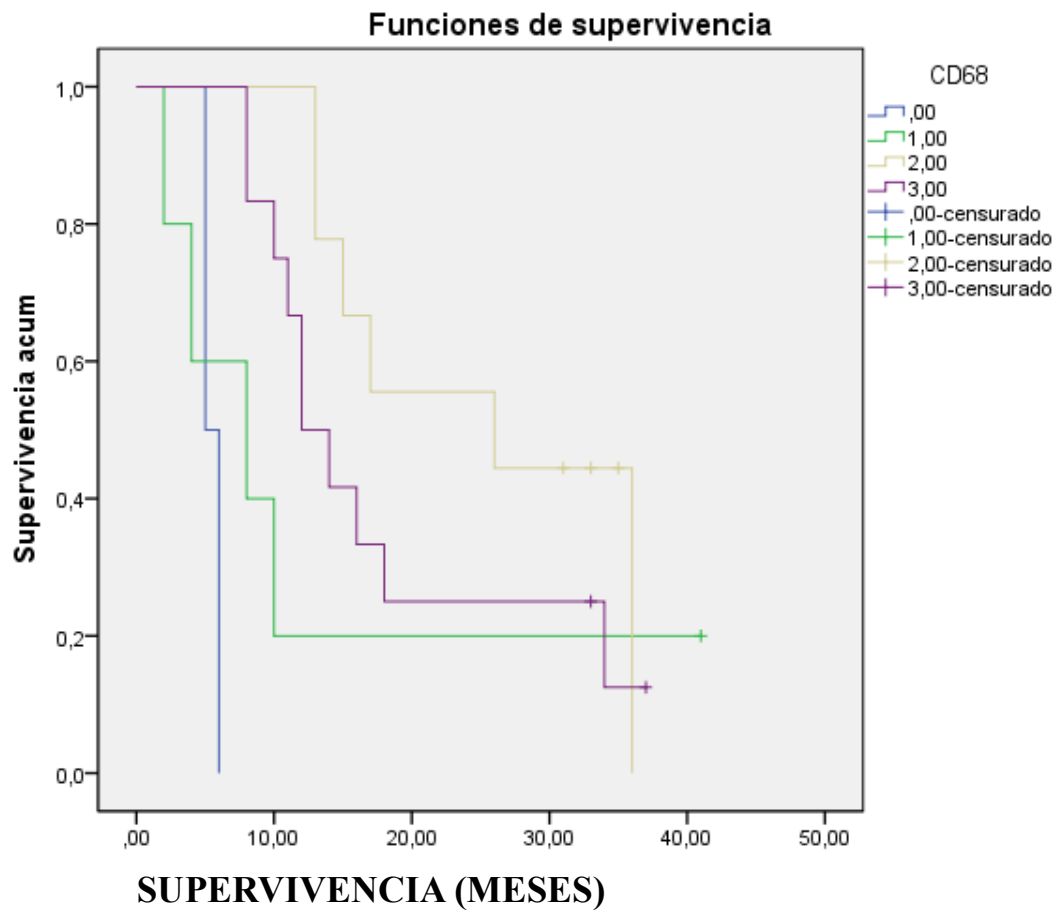


FIGURA 4.13. Curvas de Kaplan Meier para según la variable CD68 categorizada, P de log Rank: 0,002.

**4.2.4.3. ANÁLISIS MULTIVARIANTE**

Se realizó un análisis multivariante, según el modelo de riesgos proporcionales o regresión de Cox con el fin de identificar factores pronósticos independientes radiológicos e histológicos.

En todos los análisis se incluyó la edad.

**4.2.4.3.1. ANÁLISIS MULTIVARIANTE DATOS RADIOLÓGICOS Y LA EDAD**

Se realizó un análisis de regresión de Cox que incluyó todas las variables radiológicas tumorales y peritumorales, así como la edad. Las variables que resultaron significativas se muestran en la tabla 4.7.

	P	B	Exp (B)	95% IC para Exp (B)	
				Bajo	Alto
ADCrPERITM	0,02	-0,71	0,49	0,26	0,92
CHO/NAA PERITM	0,03	0,81	2,25	1,07	4,71
NLIP1,3 TM	0,01	0,22	1,24	1,04	1,48
EDAD	0,02	0,03	1,03	1,01	1,05

**TABLA 4.7. Análisis multivariante datos radiológicos y edad.**

Se obtuvo una prueba ómnibus sobre los coeficientes del modelo que explicaba la probabilidad de supervivencia con una  $p < 0,0001$ .

El cociente CHO/NAA PERITM fue el factor pronóstico de supervivencia más importante con un exp (B) de 2,25 (IC 95% 1,07 – 4,71 ; $p=0,03$ ). Este valor indica que por cada unidad adicional que se incremente el cociente CHO/NAA PERITM, aumenta 2,25 veces la función de riesgo para el evento muerte respecto aquellos que no tienen ese incremento, controlando todos los otros factores en el modelo. Por tanto, la probabilidad de morir aumentarían en un 125% con cada incremento de la unidad del cociente.

El exp (B) de ADCr PERITM fue 0,49 (IC 95% 0,26-0,92;  $P=0,02$ ) y como el valor Beta (B) fue negativo, se interpreta que por cada unidad adicional ADCr PERITM se reduciría un 51% la probabilidad de morir.

El exp (B) de Nlip1.3 TM fue de 1,24 (IC 95% 1,04-1,48; $P=0,01$ ) por cada unidad de Nlip1.3 TM aumentarían la probabilidad de muerte en un 24%.

La edad tuvo un exp (B) de 1,03 (IC 1,01-1,05;p=0,02) indicando que por cada año de vida aumenta un 3% la probabilidad de muerte.

#### **4.2.4.3.2. ANÁLISIS MULTIVARIANTE DATOS HISTOLÓGICOS Y LA EDAD**

Se realizó un análisis de regresión de Cox que incluyó todas las variables histológicas obtenidas del tejido peritumoral, así como la edad. Las variables que resultaron significativas se muestran en la tabla 4.8.

Variables	P	Exp (B)	B	95% IC para Exp (B)	
				Inferior	Superior
<b>GFAP</b>	<b>0,01</b>	3,730	1,31	1,30	10,68
<b>MV</b>	<b>0,01</b>	3,667	1,29	1,39	9,64
<b>EDAD</b>	<b>0,03</b>	1,03	0,03	1,01	1,06

**TABLA 4.8. Análisis multivariante datos histológicos y edad.**

Se obtuvo una prueba ómnibus sobre los coeficientes del modelo que explicaba la probabilidad de supervivencia con una  $p < 0,002$ .

El GFAP fue el factor pronóstico de supervivencia más importante con un exp (B) de 3,73 (IC 95% 1,30-10,78;  $p=0,01$ ) la probabilidad de morir aumentaría un 273% con cada incremento de la unidad.

El exp (B) de MV fue 3,66 (IC 95% 1,39-9,64;  $p=0,01$ ) lo que se interpreta que por cada unidad adicional de MV, aumentaría la probabilidad de muerte en un 266%.

El exp (B) de la edad fue 1,03 (IC 95% 1,01-1,06;  $p=0,03$ ) el mismo que en el modelo multivariante de datos radiológicos.



# DISCUSIÓN



## **5. DISCUSIÓN**

El glioblastoma multiforme es el tumor cerebral primario con mayor morbilidad y mortalidad, constituyendo la primera causa de muerte entre los tumores astrocitarios.

El objetivo de las investigaciones en los últimos años ha sido mejorar la media de supervivencia y la calidad de vida de estos pacientes, aunque los resultados obtenidos no han permitido modificar sustancialmente la evolución de estos pacientes.

### **5.1 INFILTRACIÓN PERITUMORAL**

A pesar de los avances terapéuticos, los protocolos actuales continúan siendo inefectivos, debidos en gran parte a la infiltración peritumoral que imposibilita la resección total.

La heterogeneidad tumoral no sólo está limitada al tumor sino que afecta también a la región peritumoral, la cual posee propiedades específicas. Pocos estudios se han centrado en el tejido peritumoral y su microambiente, a pesar de que el 90% de las recidivas ocurren en esta área como ya se comentó en la introducción <sup>105</sup>.

Es muy importante estudiar la presencia de infiltración peritumoral antes de la cirugía para optimizar la calidad de la resección. La RM es la mejor técnica de la que disponemos para analizar y delimitar los tumores cerebrales. Por lo tanto, consideramos que es necesario hacer estudios sistemáticos del área peritumoral en el GBM, con el objetivo de establecer una correlación anatomo-radiológica que pudiera diseñar estrategias terapéuticas, quirúrgicas y/o radiológicas, más eficaces para la eliminación tumoral.

#### **5.1.1. INFILTRACIÓN PERITUMORAL EN RADIOLOGÍA**

La región peritumoral desde el punto de vista radiológico ya la hemos definido como el área de cerebro que rodea al tumor y que no capta contraste en secuencias 3DT1 tras la administración de gadolinio iv. Esta región suele ser hiperintensa en secuencias T2, lo cual refleja edema vasogénico y sugiere infiltración peritumoral. La ausencia de captación de contraste en RM en la región peritumoral no indica necesariamente la ausencia de infiltración, por lo que necesitamos ayudarnos de las técnicas de RM avanzada, tales como la perfusión, difusión, espectroscopia y tensor de la difusión para definir mejor esta área.

Las técnicas de RM avanzada han sido ampliamente utilizadas para el estudio tumoral y su caracterización en bajo o alto grado, así como para valorar el grado de



infiltración peritumoral en los GBM<sup>157, 158, 159</sup>.

Hemos realizado un estudio prospectivo en un grupo de 70 pacientes con diagnóstico radiológico compatible con tumoración glial de alto grado y posterior confirmación histológica. A todos ellos se les realizó cirugía de resección.

Se emplearon por RM las técnicas avanzadas de perfusión, difusión, tensor de la difusión y espectroscopia multivoxel para el estudio del tejido tumoral y peritumoral y a su vez se correlacionaron con la supervivencia global.

Además en nuestros modelos de regresión incluimos la edad en el análisis multivariante, ya que se trata del factor pronóstico de supervivencia más pobre como ya se comentó en la introducción.

### TÉCNICAS DE RM AVANZADA

#### **5.1.1.1. DIFUSIÓN**

En nuestro estudio hemos obtenido valores relativos de ADC tanto en el tejido tumoral como peritumoral con dos factores de b; b=0 y b=1000. Esta técnica ha demostrado ser significativa para diferenciar tejido tumoral de peritumoral con una p < 0,05.

Todos los casos mostraron valores tumorales de ADC más bajos y valores más altos peritumorales, lo que traduciría una alta densidad celular y edema vasogénico periférico respectivamente. Los valores medios de ADCr b=1000 TM fueron menores  $0,652 \pm 0,39$  que los PERITM  $1,19 \pm 0,57$  con  $P < 0,001$ .

La difusión es una de las técnicas de RM avanzada que tiene potencial para ser un biomarcador, ya que depende de las estructuras microscópicas del tejido y es sensible a la densidad celular, a la necrosis, y al edema citotóxico y vasogénico. Además presenta ventajas como ser una técnica rápida, que se incluye de forma rutinaria en casi todos los estudios, que no necesita contraste y que es más reproducible que otras técnicas, como la perfusión<sup>160</sup>.

En nuestro estudio hemos seleccionado los valores mínimos de ADC y no el valor medio de ADC. En el estudio de Shankar et al.<sup>160</sup> demostraron que los valores relativos mínimos de ADC, en vez de los valores medios de ADC, se correlacionaban mejor con la supervivencia. Esto se atribuye a la heterogeneidad conocida del tumor, de manera que los valores mínimos de ADC se correlacionarían con el área de mayor malignidad del tumor.

No obstante, estudios como el de Castillo et al.<sup>161</sup> y Catalaa<sup>162</sup> et al. , encontraron que en glioblastomas multiformes los valores de difusión no eran capaces de diferenciar el tejido tumoral del edema periférico. Sin embargo, se han postulado después otros estudios<sup>163, 164</sup>, con similares resultados que nuestro estudio y que sí indican que la difusión puede diferenciar el tejido tumoral del edema perilesional o tejido peritumoral.

### **5.1.1.2. TENSOR DE LA DIFUSIÓN**

La fracción de anisotropía (FA) en GBM puede ser utilizado como un marcador de la integridad microestructural del tejido cerebral <sup>165</sup>.

Sinha et al. <sup>166</sup> explicaron que la disminución de los valores de FA dentro de los tumores cerebrales se debía a una pérdida de la organización estructural, mientras que Beppu et al. <sup>167</sup> señalaron que existía una correlación positiva entre los valores de FA con la celularidad y vascularidad tumoral. Sin embargo, todavía existe controversia sobre la relación de los valores de FA y la celularidad del tumor.

En estudios más recientes, se ha demostrado que existe una relación negativa entre los valores de ADC y la celularidad tumoral <sup>168, 169</sup>.

Gupta et al. <sup>75</sup> demostraron una disminución de los valores de FA en la región peritumoral de los GBM, atribuible a la presencia de infiltración peritumoral que destruiría la integridad de las fibras de sustancia blanca.

Las discrepancias que existen en los valores de FA entre los diferentes estudios podría explicarse por la metodología empleada en la selección de ROIS o a las cohortes de pacientes tan pequeñas. A pesar de que los valores de FA muestran una gran variabilidad entre los diferentes compartimentos de glioblastomas, algunos autores sugieren que la segmentación del tumor según su heterogeneidad ayudaría a obtener resultados más homogéneos entre distintos estudios <sup>170, 171</sup>.

Huber et al. <sup>172</sup> realizaron una segmentación del tejido tumoral de GBM en tres regiones: región con captación de contraste, región sin captación de contraste y región central tumoral. Los pacientes con valores bajos de FA en la región tumoral con captación de contraste demostraron una disminución significativa de la supervivencia en el análisis univariante. Sin embargo en el análisis multivariante los valores de FA no fueron identificados como parámetros pronósticos independientes tales como la edad o el índice de Karnofsky. Los valores de FA en las regiones sin captación de contraste y en la región central no mostraron influencia en el análisis de supervivencia.

Price et al. <sup>173</sup> utilizaron el DTI en un estudio que incluyó a 50 pacientes con GBM para definir el área de infiltración peritumoral mediante RM 3T. Se comprobó que las áreas de infiltración peritumoral presentaron mayor VSCr, así como elevación del cociente del espectro CHO/CR y disminución de los cocientes NAA/CR y NAA/CHO respecto a las zonas sin invasión peritumoral. Los datos fueron procesados mediante la herramienta FDT en FSL (FMRIB, Oxford, UK).

Varios estudios han demostrado que las regiones invasivas determinadas mediante DTI pueden predecir el sitio de progresión tumoral mejor que el contraste i.v <sup>174, 175</sup>.

Se ha sugerido que detectar el sitio de progresión tumoral es más importante que identificar la verdadera extensión de la invasión <sup>176</sup>.

En nuestro estudio hemos seleccionados los ROIS con los valores más bajos de FA tanto en el tejido tumoral como peritumoral sin realizar una segmentación del tejido como proponen algunos estudios, lo que puede ser considerado una limitación.

Los valores medios de FAr TM  $0,253 \pm 0,104$  fueron menores que los PERITM  $0,338 \pm 0,159$  con  $P < 0,001$ . La disminución de la FA relativa tumoral sería atribuible a la pérdida de la organización estructural como señalaban Sinha et al.<sup>166</sup> y la disminución de la FA en la región peritumoral a la infiltración peritumoral demostrada por Gupta et al.<sup>75</sup>. Por tanto la FA sería válida para distinguir tejido tumoral del peritumoral en glioblastomas multiformes.

Sin embargo no se demostraron diferencias estadísticamente significativas de los valores de FA respecto a los modelos de supervivencia, de manera que el tensor de la difusión no se podría considerar un factor pronóstico independiente según nuestros resultados.

Sería interesante diseñar estudios con más pacientes que incluyeran esta técnica y la segmentación propuesta del tejido, para conseguir una mayor homogenización de resultados que implicara una mayor repercusión del tensor de la difusión en los gliomas de alto grado.

### **5.1.1.3. PERFUSIÓN**

Las técnicas de perfusión por RM permiten la valoración de la microvasculatura cerebral mediante los cambios de señal debidos al paso intravascular de un trazador. La técnica más empleada se basa en la susceptibilidad magnética del gadolinio en secuencias T2\* y los parámetros más comúnmente utilizados son: el volumen sanguíneo cerebral (VSC), el tiempo de tránsito medio (TTM) y el flujo sanguíneo cerebral (FSC).

La angiogénesis tumoral se puede medir de forma indirecta e in vivo a partir de los mapas de volumen sanguíneo cerebral (VSC) de la perfusión. Además la perfusión es una medida indirecta de la actividad metabólica.

En nuestro estudio hemos realizado la técnica de susceptibilidad magnética ya que es la más utilizada para el estudio de la angiogénesis tumoral y hemos escogido como parámetro hemodinámico el volumen sanguíneo cerebral relativo (VSCr).

Los valores de VSCr se han asociado con la gradación tumoral y la vascularización<sup>177, 178, 78</sup>.

Law et al. reportaron que los valores de VSCr son los mejores para discriminar el grado tumoral, seguido del FSC, el VSC y el k trans. Sin embargo, no encontraron correlación con el TTM<sup>177</sup>. En otro estudio, también Law et al. reportaron que valores de VSCr por encima de 1,75 se asociaban a una progresión más rápida que pacientes con menores valores de VSCr<sup>78</sup>.

Sin embargo, Mills et al. encontraron que los valores relativos de VSCr no eran factores pronósticos independientes<sup>179</sup>.

Sadegui et al.<sup>180</sup> reportaron una correlación positiva entre los valores del VSC, la

proliferación endotelial, y la actividad mitótica en 65 pacientes con gliomas con muestras de biopsia.

La **tabla 5.1** muestra datos recogidos de varios estudios con RM-perfusión en gliomas de alto grado.

<b>Referencia</b>	<b>Número de pacientes</b>	<b>Correlación</b>	<b>Nivel de significación</b>
<b>Law et al.</b> <sup>177</sup>	73	VSCr – grado Ktrans - grado	$p < 0.0005$ $p = 0,027$
<b>Law et al.</b> <sup>78</sup>	73	VSCr – grado FSC – grado VSC - grado K trans- grado TTM-grado	$pp < 0.0001$ $p < 0.0001$ $p < 0.0001$ $p < 0.0001$ $p = 0.448$
<b>Law et al.</b> <sup>178</sup>	189	VSCr – tiempo de progresión VSCr – supervivencia	$p < 0.0001$ $p > 0.63$
<b>Mills et al.</b> <sup>179</sup>	27	VSC - grado K trans- grado VSC – supervivencia K trans- supervivencia	$p < 0.01$ $p < 0.01$ $p = 0.004$ $p = 0.008$
<b>Sadegui et al.</b> <sup>180</sup>	14	VSC- proliferación endotelial VSC- actividad mitótica VSC-necrosis VSC- pleomorfismo celular	$p < 0.01$ $p < 0.001$ $p = 0,49$ $p = 0.2$

**TABLA 5.1** reeditada a partir de los datos de <sup>171</sup>.

La región peritumoral de los glioblastomas muestra un incremento del VSCr atribuible a la infiltración tumoral y a la neo-angiogénesis asociada <sup>181</sup>.

El aumento del VSCr parece ser la mejor medida para identificar áreas de infiltración tumoral y se ha sugerido como el biomarcador que precede a la captación de contraste tumoral <sup>182</sup>.

En nuestro estudio los valores medios relativos de VSCr tumoral ( $7,49 \pm 2,60$ ) fueron distintos que los valores medios relativos de VSCr peritumoral ( $2,52 \pm 1,11$ ) con  $p < 0,001$ , siendo los valores tumorales mayores que los peritumorales.

En los diagramas de cajas de perfusión (**figura 4.1**) se aprecia una mayor dispersión de los valores tumorales respecto a los peritumorales que están más agrupados.

Respecto a los análisis de supervivencia ni la perfusión tumoral ni peritumoral han demostrado ser factores pronósticos independientes.

### **5.1.1.4. ESPECTROSCOPIA**

La espectroscopia RM es una poderosa técnica de imagen no invasiva que ofrece información metabólica de la biología del tumor cerebral <sup>181</sup>. Se intentan detectar cambios en la concentración de metabolitos en las lesiones cerebrales que difieran del tejido cerebral normal.

Puede ayudar a delimitar los márgenes tumorales, los cuales están infra o sobreestimados en un 40 % de los casos si se delimita el tamaño tumoral sólo con la secuencia con contraste i.v <sup>183, 184</sup>. Desafortunadamente no existen valores de corte de los cocientes de los metabolitos que nos distingan claramente el tejido tumoral <sup>78</sup>.

Hemos realizado un análisis del tejido tumoral y peritumoral mediante el sistema de espectroscopia multivoxel.

Las medias tumorales de los cocientes de CHO/NAA y NAA/CR así como los picos normalizados de lactato y lípidos a 0.9 ppm y 1.3 ppm fueron diferentes de las medias peritumorales de dichos valores con una  $p < 0,05$ . Sólo el cociente CHO/CR no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los valores tumorales y peritumorales.

Estudios previos han demostrado que existe un aumento del cociente CHO/CR en la región peritumoral atribuible a la infiltración tumoral <sup>185, 186</sup>.

En nuestro estudio la media de los valores CHO/CR tumoral fue de  $1,329 \pm 0,989$  y la media de los valores de CHO/CR peritumoral fue de  $1,181 \pm 0,890$ . Los cocientes de CHO/CR están elevados en el glioblastoma multiforme tanto el tejido tumoral como peritumoral por lo que no son un biomarcador que nos permita delimitar el área tumoral de la peritumoral, pero sí nos permitiría identificar áreas de mayor infiltración tumoral en la región peritumoral según elevaciones del cociente CHO/CR como sugieren algunos estudios <sup>185, 186</sup>.

NAA es un marcador de integridad neuronal. Según Law et al. no existe un reemplazo o destrucción neuronal en la región peritumoral, por lo que no existiría una disminución del cociente NAA/CR en esta región <sup>185</sup>. En el glioblastoma las células tumorales infiltran a través de los canales vasculares pero no destruyen la citoarquitectura preexistente <sup>181</sup>.

En nuestro estudio la media de los valores de NAA/CR tumoral fue de  $0,750 \pm 0,736$  mientras que la media de los valores de NAA/CR peritumoral fue de  $1,471 \pm 0,817$ . Se observa que existe una elevación del cociente de NAA/CR en la región peritumoral que explicaría la teoría de la viabilidad neuronal en la región peritumoral explicada previamente.

La media de los valores de CHO/NAA tumoral fue de  $1,269 \pm 1,261$  y la media de los valores de CHO/NAA peritumoral fue de  $0,610 \pm 0,617$ , ambas diferencias son estadísticamente significativas con una  $p < 0,05$  para diferenciar tejido tumoral de peritumoral. La elevación de este cociente indica que existe tejido tumoral y

destrucción neuronal, por lo que este cociente está más elevado en la región tumoral.

Roldán-Valadez et al.<sup>187</sup> obtuvieron que el cociente CHO/NAA tumoral era el biomarcador con mayor impacto en el análisis de supervivencia que realizaron a 28 pacientes con tumores gliales de alto grado (11 GBM y 17 astrocitomas anaplásicos). De las 20 variables que estudiaron sólo 3 (CHO/NAA, cociente lípidos y lactato/creatina y edad) mostraron ser estadísticamente significativos en el análisis de supervivencia.

En nuestro análisis de supervivencia el cociente peritumoral CHO/NAA peritumoral también ha demostrado ser un factor pronóstico independiente.

Los picos de lípidos y lactato se ha normalizado al dividirlos por la mediana de la NAA de la sustancia blanca contralateral, de manera que se facilita la comparación entre pacientes. En algunos estudios se expresan conjuntamente como un pico nLL que representa la suma de lactatos y lípidos dividido por la mediana de NAA de la sustancia blanca. En nuestro estudio hemos estudiado individualmente los cocientes Nlip0.9, Nlip 1.3 y Nlac.

El lactato es un producto final de la glicolisis no oxidativa por lo que su presencia se correlaciona con hipoxia en el tejido tumoral y con el crecimiento tumoral no regulado<sup>188</sup>. Los lípidos han sido correlacionados con la necrosis celular tumoral<sup>189</sup>. Se ha postulado que niveles normalizados de lípidos y lactato en el momento del diagnóstico se asocian con peores supervivencias, en estudios como el de Li et al.<sup>190</sup>, Roldán-Valadez et al.<sup>187</sup> y Saraswathy et al.<sup>191</sup>. Además éstos últimos consideraron el lactato el indicador de peor pronóstico en pacientes con GBM. Por tanto estos datos coinciden con nuestros resultados, ya que en nuestros casos los picos normalizados de lípido 1.3 tumorales han resultado ser factores pronósticos independientes.

Debido a su importante implicación en el análisis de supervivencia consideramos que es muy interesante analizar estos valores en el momento del diagnóstico e incluirlos en la práctica clínica habitual.

## **5.1.2. INFILTRACIÓN PERITUMORAL EN HISTOLOGÍA**

### **5.1.2.1. GFAP**

**GFAP** (proteína gliofibrilar ácida) fue descrito por primera vez en 1971 por Eng et al.<sup>192</sup>, y es una proteína del citoesqueleto que se expresa en células astrogiales y en células madre neurales. También se expresa en tumores astrogiales como el astrocitoma y el GBM. Es por tanto un marcador de infiltración tumoral en GBM. Jung et al.<sup>193</sup> examinaron los niveles de GFAP en el suero de los pacientes con GBM y concluyeron que podría ser un nuevo biomarcador de GBM. De hecho el GFAP tiene ventajas como biomarcador, ya que es relativamente estable en sangre y es fácil de medir en las técnicas de ELISA<sup>194</sup>.

Además se ha observado que la expresión de GFAP en las muestras de tejido se correlaciona con la necrosis tumoral y con el volumen tumoral de forma positiva<sup>194</sup>. Sin embargo, en nuestro estudio no se ha obtenido una correlación significativa entre los valores de GFAP y los picos normalizados de lípidos como marcadores de necrosis.

No obstante, el GFAP ha mostrado tener una correlación negativa significativa con los valores relativos tanto del ADC tumoral como peritumoral, lo que reafirmaría la función de biomarcador de la difusión como marcador de celularidad.

Además se ha observado una correlación positiva con la edad con una  $p < 0,05$ . Los pacientes mayores de 65 años tienen subtipos moleculares más agresivos y peor pronóstico que los pacientes jóvenes, como ya se comentó en la introducción<sup>85</sup>.

### **5.1.2.2. MALFORMACIÓN VASCULAR**

La malformación vascular (MV) en el tejido peritumoral se representa por vasos tortuosos de aspecto glomeruloide. Nuestra hipótesis es que esos vasos se han formado a partir del proceso de cooptación demostrado por Caspani et al.<sup>122</sup> en el que el pericito desempeña un papel fundamental y sería el mediador entre células tumorales y vasos sanguíneos.

La cooptación vascular consiste en la conversión de capilares normales en estructuras dobladas y de aspecto glomerular en la ausencia de angiogénesis o formación de nuevos vasos. Se produce a partir de la interacción de las células tumorales del GBM con los vasos sanguíneos preexistentes para promover la infiltración y la progresión tumoral.

En nuestro estudio hemos encontrado una correlación positiva estadísticamente significativa entre la malformación vascular y el NG2 como marcador del pericito lo que apoyaría nuestra hipótesis. En las muestras de tejido peritumoral una mayor cantidad de NG2 se asociaba a mayor malformación vascular, con una  $p < 0,05$ .

A su vez la malformación vascular ha demostrado ser un factor pronóstico independiente en el análisis de supervivencia, con una correlación negativa y  $p < 0,05$ .

El marcador de malformación vascular en las técnicas radiológicas sería la perfusión representado por el VSCr. Se ha establecido una correlación positiva estadísticamente significativa con la perfusión tumoral pero no con la peritumoral. De manera que podemos afirmar que la histología detecta cambios antes que la radiología, ya que a pesar de que existe un aumento de la vascularización en la región peritumoral tal y como se demuestra en la pieza quirúrgica no hemos conseguido una correlación estadísticamente significativa entre ambas. No obstante nuestro estudio está limitado por el pequeño tamaño muestral, se necesitarían estudios más amplios e incluir otros parámetros de la perfusión en la región peritumoral como el tiempo de transito medio o el flujo sanguíneo para confirmar este hallazgo.

La infraestimación de la perfusión peritumoral también se debe a que el tamaño del voxel es demasiado grande para detectar la alteración microscópica de la perfusión.

Además hemos obtenido una correlación positiva estadísticamente significativa entre la malformación vascular y el cociente de CHO/CR peritumoral. Estudios previos han demostrado que existe un aumento del cociente CHO/CR en la región peritumoral atribuible a la infiltración tumoral<sup>195, 186</sup>, por tanto el aumento de la vascularización peritumoral se asociaría a mayor infiltración. Se ha demostrado que los pericitos que interaccionan con el tumor condicionan la malformación vascular debida a la coaptación vascular y cambios mecánicos del pericito, que además de contorsionar los vasos, favorecen la infiltración de células tumorales<sup>156, 122</sup>.

También se ha obtenido una correlación positiva entre la malformación vascular y el GFAP que representa infiltración tumoral como comentamos previamente.

### **5.1.2.3. NG2**

El proteoglicano NG2, también conocido como proteoglicano 4 condroitin sulfato tiene un interés considerable en el contexto de la biología tumoral ya que su expresión no sólo se limita a las células tumorales, sino que también se expresa en varios tipos de células estromales en el microambiente tumoral. Es un componente frecuente en los gliomas, melanomas y sarcomas, y se ha postulado que un incremento de la expresión de NG2 en las células tumorales contribuye a crecimiento tumoral agresivo y peor pronóstico<sup>196</sup>.

En nuestro proyecto hemos utilizado el NG2 como marcador del pericito. En las biopsias analizadas mediante el protocolo de inmunohistoquímica descrito, las células tumorales no presentaron una inmunopositividad significativa.



Sin embargo, los pericitos del cerebro, tanto los relacionados con el tumor, como los de regiones alejadas del tumor (que podrían considerarse como controles) presentaron una inmunorreactividad muy selectiva.

Nuestra hipótesis es que una mayor expresión de NG2 (más pericitos) se asocia a mayor malformación de los vasos en el margen del tumor (como consecuencia de una mayor coaptación vascular), que a su vez, irán asociados a mayor nivel de infiltración tumoral (más células GFAP positivas perivasculares); y todo ello asociado a una menor presencia de reacción inmune (células CD68). Este escenario es el que conllevaría un peor pronóstico.

En el análisis de correlación de Spearman nuestros datos han dado las correlaciones que esperábamos, positiva entre GFAP, MV y NG2 y negativa entre éstas tres y el CD68 con una  $p < 0,05$ .

En nuestros datos hemos obtenido una correlación positiva del NG2 con la perfusión tumoral con  $p < 0,05$ , pero no con la perfusión peritumoral. Como ya hemos discutido previamente, existe una infraestimación de la perfusión peritumoral radiológica respecto a la histología.

Nuestra hipótesis es que todos los pericitos de la muestra, que se corresponde con la zona de infiltración peritumoral, están condicionados por el tumor. Por lo tanto la perfusión tumoral aumenta a mayor número de pericitos.

El desarrollo de los vasos sanguíneos tumorales depende íntimamente de la interacción entre las células endoteliales y los pericitos<sup>197</sup>.

El pericito modifica la pared del vaso mediante la coaptación vascular y flectopodia demostrado por Caspani et al.<sup>122</sup> y hace que el tumor este más vascularizado. A través de distintos mecanismos moleculares condiciona el vaso y enlentece el flujo, lo que produce hipoxia con aumento de los factores tróficos y finalmente neovascularización.

Además hemos obtenido una correlación negativa con  $p < 0,05$  entre en NG2 y los lípidos peritumorales normalizados a 1,3ppm. Los lípidos peritumorales representan necrosis, y en el caso en que esté presente la necrosis quiere decir que existe destrucción celular y por tanto activación del sistema inmune del huésped. De esta manera nosotros hemos interpretado que a mayor cantidad de pericitos que están condicionados por el tumor, menor reacción inmune del huésped y por tanto menos muerte celular en el frente de infiltración peritumoral, menos lípidos.

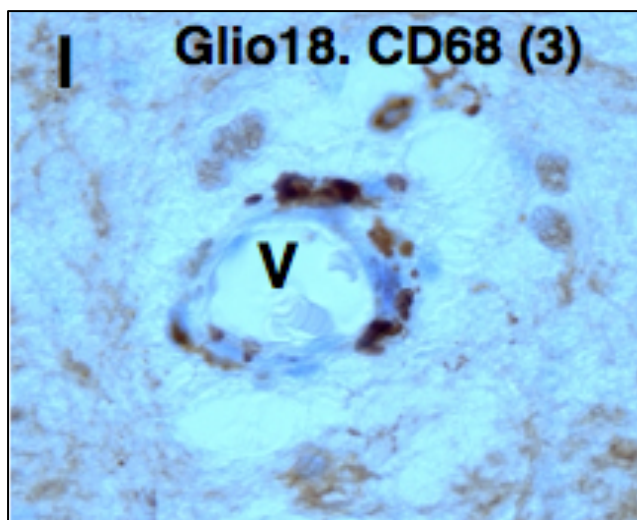
#### **5.1.2.4. CD68**

El CD68 ha sido aceptado como marcador de monocitos y macrófagos tisulares, y como mediador en el reclutamiento y activación de macrófagos<sup>198</sup>.

Los mecanismos subyacentes que condicionan la respuesta inmunosupresora tumoral son poco conocidos, y menos en el área perivascular donde las células tumorales infiltran y metastatizan.

Nuestra hipótesis es que los pericitos perivasculares cerebrales interaccionan con las células tumorales para crear un ambiente de inmunosupresión que favorezca la infiltración tumoral. Esta hipótesis ha sido publicada recientemente nuestro grupo de trabajo de Valdor et al.<sup>156</sup>, los cuales han demostrado que los pericitos que interaccionan con las células de GBM presentan un fenotipo anti-inflamatorio que condiciona un ambiente de inmunosupresión y reduce la expresión de células T.

En nuestros datos el CD68 tuvo una correlación negativa estadísticamente significativa con el resto de variables histológicas (GFAP, MV y NG2), lo que se traduce que una mayor cantidad de macrófagos se asociaba a un menor número de pericitos, tal y como se representa en la siguiente **figura 5.1**.



**FIGURA 5.1.**

Existen numerosos estudios que relacionan el aumento de macrófagos tumorales (TAM) con la progresión tumoral, ya que consideran que los macrófagos tumorales estimulan la migración celular, la invasión y la inmunidad supresora anti-tumoral<sup>199</sup><sup>197</sup>. Como resultado de todo esto, el aumento de macrófagos tumorales se asocia a peor pronóstico.

Sin embargo, en nuestro estudio hemos estudiado los macrófagos peritumorales que obteníamos de la muestra quirúrgica de tejido peritumoral. Nuestra hipótesis es que un mayor número de macrófagos CD68 se asocia a un mejor pronóstico; y los resultados han mostrado que el marcador CD68 se correlaciona con la supervivencia con un  $p < 0,05$ . Por tanto, el aumento de CD68 sería un marcador de buen pronóstico.

Chen et al.<sup>200</sup> estudiaron el nicho perivascular en GBM y demostraron que el CD14 como marcador de macrófagos estaba asociado a zonas de necrosis. No encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la expresión de GFAP

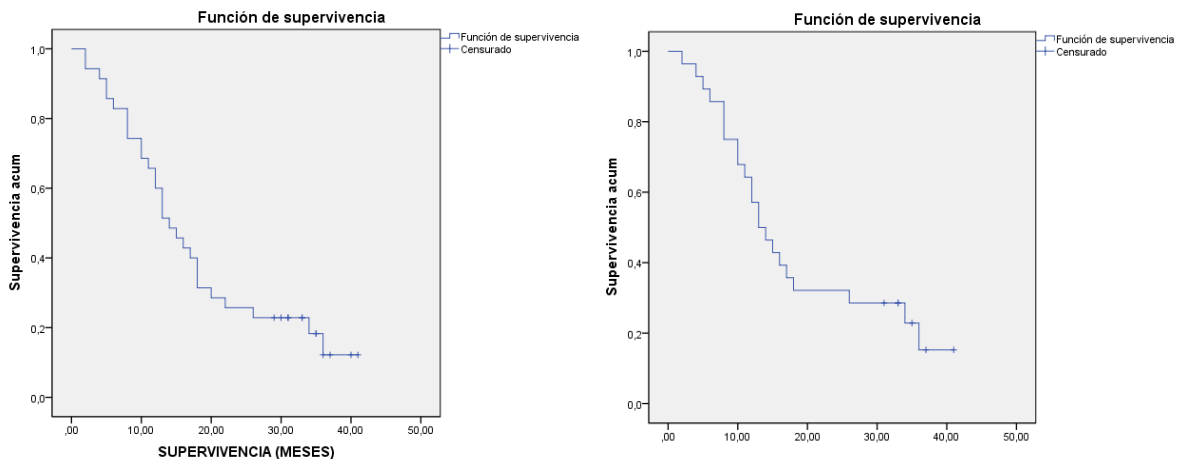
y el CD14 en los cuatro tipos de patrones microvasculares estudiados en el nicho. En nuestro estudio el CD68 ha presentado una correlación con signo positivo con los lípidos peritumorales (NLIP 0.9 y NLIP1.3) sin embargo la correlación no ha sido estadísticamente significativa.

Sin embargo sí hemos encontrado una correlación negativa estadísticamente significativa entre los valores de GFAP y CD68 como comentamos previamente.

A diferencia del resto de los marcadores histológicos, el CD68 demostró una correlación negativa estadísticamente significativa con la perfusión tumoral.

También ha demostrado una correlación negativa estadísticamente significativa con el cociente de CHO/NAA peritumoral, esto se explicaría porque el aumento de CD68 evitaría que el tumor pueda avanzar e infiltrar con la siguiente destrucción neural y aumento del cociente CHO/NAA.

**5.2 SUPERVIVENCIA EN GBM**



**FIGURA 5.2. Curvas de Supervivencia de Kaplan Meier de los 70 pacientes con datos radiológicos (izquierda) y los 28 pacientes con datos histológicos y radiológicos (derecha).**

La media de supervivencia de los 70 pacientes fue  $18,06 \pm 11,15$  meses (media  $\pm$  desviación típica) mientras que la media de supervivencia de los 28 pacientes fue de  $18,14 \pm 11,91$  (media  $\pm$  desviación típica ). Las curvas de supervivencia entre ambos grupos son similares como se representa en la figura 5.3.

Según la literatura, los pacientes con GBM tienen una mediana de supervivencia pobre, de 12-15 meses tras el diagnóstico<sup>101</sup> , dato que coincide con nuestros resultados ya que la mediana de supervivencia de ambas series fue de 14 meses.

Los pacientes con glioblastomas multiformes han demostrado tiempos de supervivencia variables<sup>201</sup>, algunos pacientes sólo viven unas semanas tras el diagnóstico mientras que otros permanecen vivos varios años. En nuestros pacientes, la supervivencia más corta fue de 2 meses, y la más larga fue de más de 41 meses tras el diagnóstico.

Por tanto, este patrón de agresividad tumoral sugiere que el tumor responde al tratamiento y que además la supervivencia tumoral está influenciada por características individuales del tumor y del paciente.

Una mejor comprensión de las variables asociadas con los tiempos de supervivencia del GBM podría ayudar a los médicos a identificar a los pacientes que tienen menos probabilidades de responder a las terapias estándar y podría ayudar a comprender los mecanismos subyacentes a la progresión de la enfermedad<sup>202</sup>.

La mayoría de los GBM son diagnosticados y seguidos mediante RM cerebral. Por tanto, la relación entre la supervivencia y la apariencia tumoral en RM es muy importante. Hemos analizado características de imagen de las técnicas de RM avanzada en relación con la supervivencia para obtener biomarcadores en imagen al inicio del diagnóstico que nos ayuden a evitar efectos secundarios de terapias innecesarias.

Un biomarcador se define como una característica no biológica que puede ser medida y evaluada de una manera objetiva y se considera un indicador de un proceso biológico normal o patológico, así como de la respuesta farmacológica a una intervención terapéutica<sup>203</sup>.

Las características de imagen convencional de los GBM como localización, tamaño, realce, necrosis y edema han sido estudiadas como predictores de supervivencia<sup>204, 205</sup>. La literatura muestra claramente que estos hallazgos no sólo son pobres para predecir el grado tumoral, sino también la supervivencia o progresión.

En nuestro estudio hemos estudiado a 70 pacientes con diagnóstico de GBM con las cuatro técnicas de RM avanzada. En 28 casos además se realizó resección quirúrgica de la zona de mayor infiltración peritumoral definida radiológicamente con la finalidad de estudiar el frente de infiltración peritumoral. El último objetivo de nuestro estudio ha sido obtener biomarcadores radiológicos e histológicos en el momento del diagnóstico que se asocien con la supervivencia.

### **5.2.1. DATOS RADIOLÓGICOS Y SUPERVIVENCIA**

#### **5.2.1.1. ADC PERITUMORAL COMO BIOMARCADOR Y FACTOR PRONÓSTICO INDEPENDIENTE**

Nuestro estudio sugiere que el ADC peritumoral puede ser considerado un biomarcador de imagen al diagnóstico inicial de GBM.

Las curvas de Kaplan Meier indicaron que el valor de corte 1,31 de ADCrPERITM se asociaba con la supervivencia global con una  $p < 0,01$  tal y como se representa en la **figura 4.8**. Pacientes con valores menores de 1,31 de ADCr PERITM al diagnóstico tendrían una menor supervivencia que los pacientes con valores mayores de 1,31 y la diferencia de supervivencias entre ambos grupos va aumentando con el tiempo como se puede apreciar en la gráfica.

Además hemos obtenido una correlación negativa significativa tanto del ADCr tumoral como peritumoral con los valores de GFAP en la pieza quirúrgica peritumoral, lo que reafirmaría la función de biomarcador de la difusión para la valoración de celularidad e infiltración tumoral. Los coeficientes de correlación de Pearson fueron -

0,553 entre ADCTMr y GFAP, y -0,350 entre ADC peritumoral y GFAP, ambos con  $p=0,05$ .

Múltiples estudios han demostrado que los valores mínimos de ADC tumoral pre tratamiento se correlacionan con mayor celularidad y con la supervivencia<sup>206, 207</sup>.

Shankar et al.<sup>160</sup> analizaron 84 pacientes con GBM pre-tratamiento y obtuvieron que el valor de corte de ADCrTM 0,75 se correlacionaba con la supervivencia. Sin embargo en nuestro estudio las curvas de supervivencia de Kaplan Meier con el ADC tumoral no han resultado significativas.

Sin embargo, estudios recientes como el de Qin et al.<sup>208</sup> no han conseguido demostrar que el ADCr TM pre tratamiento se correlacione con la supervivencia, a diferencia de los valores absolutos de ADC.

Por tanto, existen múltiples estudios que estudian los valores de ADC en la región tumoral con resultados discordantes entre sí, pero no hemos encontrado publicaciones que valoren la influencia pronóstica del ADCr PERITM pre tratamiento en la supervivencia de los pacientes con GBM.

A diferencia de lo publicado en la literatura, el biomarcador que ha resultado en nuestra cohorte de pacientes ha sido el ADC peritumoral y no el ADC tumoral, que además es un factor pronóstico independiente y se ha correlacionado con el marcador histológico GFAP peritumoral.

Se necesitarían estudios prospectivos con más pacientes que confirmen nuestros hallazgos y con el fin de mejorar la fiabilidad, dos investigadores independientes deberían tomar las mediciones de ADC en cada paciente.

### **5.2.1.2. FACTORES PRONÓSTICOS RADIOLÓGICOS INDEPENDIENTES SEGÚN EL MODELO DE COX**

Uno de los hallazgos clínicos más relevantes aportados por nuestro estudio ha sido la evidencia de que el ADCr peritumoral es un biomarcador con un alto impacto en la supervivencia ( $p<0,02$ ), tal y como comentamos en el apartado anterior.

En el modelo multivariante de Cox hemos obtenido otros dos factores radiológicos pronósticos independientes, el cociente de CHO/NAA PERITM y el cociente de NLIP 1.3 TM.

El CHO/NAA PERITM ha demostrado ser el factor pronóstico independiente más influyente en el modelo, con un exp (B) de 2,25 (intervalo de confianza al 95%: 1,07-4,71 y  $p=0,03$ ). Estos hallazgos coinciden con lo publicado por Roldan-Valadez<sup>187</sup> que también obtuvieron que el cociente CHO/NAA era el más influyente con un exp (B) de 2,6, pero la diferencia es que ellos sólo analizaron el tejido tumoral.

Li et al.<sup>190</sup> estudiaron el tejido tumoral de 64 pacientes con GBM y obtuvieron que la elevación del cociente CHO/NAA y de los valores normalizados de lípidos y lactato en el diagnóstico inicial se correlacionaban con la supervivencia global, siendo los valores conjuntos de lípido y lactato los predictores con peor supervivencia asociada. En nuestra cohorte la elevación de lípidos tumorales a 1.3 ppm también han demostrado

asociarse a peor pronóstico con un Exp (B) de 1,24 (intervalo de confianza al 95%: 1,04-1,48 y  $p < 0,01$ )

En nuestro estudio, las técnicas de perfusión y tractografía no demostraron tener impacto en la supervivencia.

Un factor pronóstico importante reconocido es la edad al diagnóstico, los pacientes más jóvenes tienen supervivencias más largas<sup>209</sup>; en nuestra cohorte un incremento en la edad del paciente se asociaba a un incremento del 3% de la probabilidad de muerte.

5.2.2. DATOS HISTOLÓGICOS Y SUPERVIVENCIA

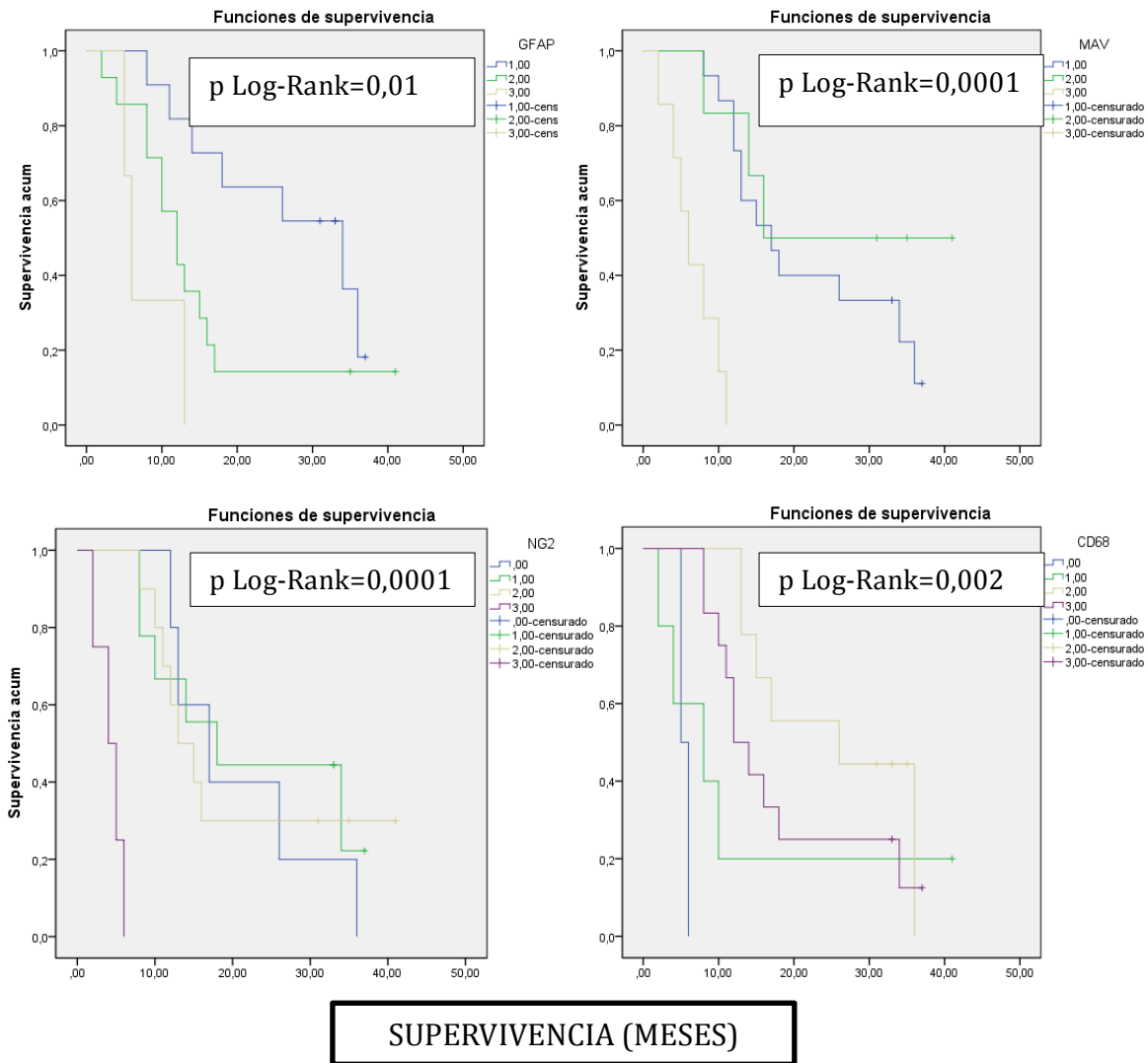


FIGURA 5.2. Curvas de Kaplan-Meier de variables histológicas categorizadas.

Todas las curvas de supervivencia de las variables histológicas categorizadas fueron significativas con una  $p < 0,05$ .

A mayor gradación de las variables histológicas peritumorales GFAP, MV y NG2 menor supervivencia.

En cambio, los valores elevados de CD68 se asociaron a mayor supervivencia.

Tsidulko et al.<sup>210</sup> compararon en un estudio reciente la significación pronóstica de la expresión de NG2, CD44 y Ki-67 en 75 pacientes con GBM. La expresión de NG2 se asoció con mal pronóstico y supervivencia menor de 12 meses. Según las curvas de Kaplan Meier, los pacientes con alta expresión de NG2 tenían una mediana de supervivencia menor de 8 meses comparada con los 13 meses que tenían los



pacientes con valores bajos de NG2.

Estos datos son similares a nuestro resultados, en los que los pacientes categorizados como 3 tenían una mediana de supervivencia de unos 7 meses frente a los pacientes categorizados como 0 y 1 cuya mediana de supervivencia era mayor de 18 meses.

Tsidulko et al. también obtuvieron que el valor de NG2 era el factor pronóstico independiente más influyente con un exp (B) de 3,43 (intervalo de confianza del 95% 1.18 – 9.93; p = 0.02).

Sin embargo el NG2 no resultó ser un factor pronóstico independiente en nuestro análisis de regresión, seguramente debido al pequeño tamaño muestral.

No hemos encontrado estudios en la literatura que relacionen los valores de GFAP, MV y CD68 con la supervivencia.

### **5.2.2.1. FACTORES PRONÓSTICOS HISTOLÓGICOS INDEPENDIENTES SEGÚN EL MODELO DE COX**

En el modelo de regresiones múltiples de Cox, los valores de GFAP y MV han resultado ser factores pronósticos independientes junto con la edad. La probabilidad de morir estaría asociada a una mayor expresión de GFAP y malformación vascular.

El GFAP ha demostrado ser el factor pronóstico independiente más influyente en el modelo, con un exp (B) de 3,73 (intervalo de confianza al 95%: 1,30 - 10,68 y p=0,01).

La MV tuvo un exp (B) de 3,66 (intervalo de confianza al 95%: 1,39 - 9,64 y p=0,01).

La edad presentó los mismo resultados que en el modelo multivariante con datos radiológicos.

### **5.3. LIMITACIONES DEL ESTUDIO**

El estudio tuvo algunas limitaciones.

Los resultados aportados son preliminares, ya que nuestro estudio estaba limitado por un tamaño muestral relativamente pequeño, sobre todo en los casos histológicos. Es necesario que se incluyan cohortes de pacientes mayores para confirmar los hallazgos aportados en nuestro estudio.

Otra de las limitaciones fue la obtención de ROIs manuales en el procesado de RM, que pueden ser subjetivos. Estudios futuros que incluyan segmentación semiautomática de rutina pueden ser necesarios para analizar los datos de una forma más objetiva.

Además todas las variables se trataron como independientes sin realizar un análisis de técnicas solapadas como proponen algunos artículos.



# CONCLUSIONES



## 6. CONCLUSIONES

1. Las técnicas de RM avanzada son capaces de valorar la infiltración peritumoral: diferencian el tejido tumoral del peritumoral de forma estadísticamente significativa, a excepción del cociente CHO/CR del espectro.
2. Las alteraciones de la microvasculatura cerebral detectadas en la pieza quirúrgica han demostrado tener una correlación significativa entre los marcadores histológicos de malformación vascular y proliferación celular GFAP con el marcador NG2 o pericito, por lo tanto podemos postular que los cambios histológicos estarían condicionadas por el pericito.
3. Los marcadores radiológicos que presentaron correlación con las alteraciones detectadas en la pieza quirúrgica fueron: GFAP con ADCr tumoral y peritumoral como marcadores de infiltración, MV con el VScr tumoral y cociente CHO/CR peritumoral, NG2 con VScr tumoral y lípidos peritumorales normalizados, y el CD68 con VScr TM y el cociente CHO/NAA peritumoral.
4. Los marcadores que resultaron ser factores pronósticos independientes respecto a la supervivencia fueron: de las variables radiológicas el ADCr peritumoral, el cociente CHO/NAA peritumoral y los valores normalizados de lípidos tumorales a 1.3ppm, y de las variables histológicas el GFAP y la malformación vascular. La edad también resultó ser un factor pronóstico independiente.



# BIBLIOGRAFÍA



## **BIBLIOGRAFÍA**

- 
- <sup>1</sup> Ostrom QT, Gittleman H, Xu J, Kromer C, Wolinsky Y, Kruchko C et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System. Tumors Diagnosed in the United States in 2009-2013. *Neuro Oncol.* 2016;1-18.
- <sup>2</sup> López-Abente G, Núñez O, Pérez-Gómez B, Aragonés N, Pollán M. La situación del cáncer en España: Informe 2015. Instituto de Salud Carlos III. Madrid, 2015.
- <sup>3</sup> Fuentes-Raspall R, Solans M, Roca-Barceló A, Vilardell L, Puigdemont M, Del Barco S, et al. Descriptive epidemiology of primary malignant and non-malignant central nervous tumors in Spain: Results from the Girona Cancer Registry (1994–2013). *Cancer Epidemiol.* 2017;50(Pt A):1-8.
- <sup>4</sup> Visser O, Ardanaz E, Botta L, Sant M, Tavilla A, Minicozzi P; EURO CARE-5 Working Group. Survival of adults with primary malignant brain tumours in Europe; Results of the EURO CARE-5 study. *Eur J Cancer.* 2015;51(15):2231-2241.
- <sup>5</sup> Código CIE-10. Nd. International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision. Consultado el día 1/2/2017. Disponible en <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2010/en#/C71.9>
- <sup>6</sup> Adamson C, Kanu OO, Mehta AI, Di C, Lin N, Mattox AK et al. Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. *Expert Opin Investig Drugs.* 2009, 8:1061-83.
- <sup>7</sup> Dohrmann D., Farwell R.J., Flannery J.T. Glioblastoma multiforme in children. *J Neurosurg.* 1976. 44 (4). *Cancer Epidemiology.* 2017;50: 1-8
- <sup>8</sup> Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res.* 2004; 64 (19): 6892 – 6899.
- <sup>9</sup> McLendon, R. E., Robinson, J. S., Jr., Chambers, D. B., Grufferman, S., and Burger, P. C. The glioblastoma multiforme in Georgia, 1977 – 1981. *Cancer.* 1985; 56) 894 – 897.
- <sup>10</sup> Kuratsu, J., Takeshima, H., and Ushio, Y. Trends in the incidence of primary intracranial tumors in Kumamoto, Japan. *Int J Clin Oncol.* 2001; 6: 183 – 191.
- <sup>11</sup> Fan, K. J. and Pezeshkpour, G. H. Ethnic distribution of primary central nervous system tumors in Washington, DC, 1971 to 1985. *J. Natl. Med. Assoc.* 1992; 84, 858 – 863.
- <sup>12</sup> Central Brain Tumor Registry of the United States. Nd. CBTRUS. Consultado el día 1/10/2017. Disponible en <http://www.cbtrus.org/datarequest/datarequest.html>.
- <sup>13</sup> Hodges LC, Smith JL, Garrett A, Tate S. Prevalence of glioblastoma multiforme in subjects with prior therapeutic radiation. *J Neurosci Nurs* 1992;24(2):79-83.
- <sup>14</sup> Relling MV, Rubnitz JE, Rivera GK, Boyett JM, Hancock ML, Felix CA et al.

---

High incidence of Epidemiology of Brain Tumors 339 secondary brain tumours after radiotherapy and antimetabolites. *Lancet*. 1999; 354: 34 – 39.

<sup>15</sup> Rosso P, Terracini B, Fears TR, Jankovic M, Fossati Bellani F, Arrighini A, et al. Second malignant tumors after elective end of therapy for a first cancer in childhood: a multicenter study in Italy. *Int. J. Cancer*. 1994; 59, 451 – 456.

<sup>16</sup> Neglia JP, Meadows AT, Robison LL, Kim TH, Newton WA, Ruymann FB et al. Second neoplasms after acute lymphoblastic leukemia in childhood. *N. Engl. J. Med*. 1991; 325: 1330 – 1336.

<sup>17</sup> Nygaard R, Garwicz S, Haldorsen T, Hertz H, Jonmundsson GK, Lanning M et al. Second malignant neoplasms in patients treated for childhood leukemia. A population-based cohort study from the Nordic countries. The Nordic Society of Pediatric Oncology and Hematology (NOPHO). *Acta Paediatr Scand*. 1991; 80: 1220 – 1228.

<sup>18</sup> Little MP, de Vathaire F, Shamsaldin A, Oberlin O, Campbell S, Grimaud E, et al. Risks of brain tumour following treatment for cancer in childhood: modification by genetic factors, radiotherapy and chemotherapy. *Int. J. Cancer*. 1998; 78: 269 – 275.

<sup>19</sup> Walter AW, Hancock ML, Pui CH, Hudson MM, Ochs JS, Rivera GK et al. Secondary brain tumors in children treated for acute lymphoblastic leukemia at St Jude Children's Research Hospital. *J. Clin. Oncol*. 1998; 16: 3761 – 3767.

<sup>20</sup> Brüstle O, Ohgaki H, Schmitt HP, Walter GF, Ostertag H, Kleihues P. Primitive neuroectodermal tumors after prophylactic central nervous system irradiation in children. Association with an activated K-ras gene. *Cancer*. 1992; 69: 2385 – 2392.

<sup>21</sup> Neglia JP, Robison LL, Stovall M, Liu Y, Packer RJ, Hammond S, et al. New primary neoplasms of the central nervous system in survivors of childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *J. Natl. Cancer Inst*. 2006; 98: 1528 – 1537.

<sup>22</sup> Soffer D., Gomori J. M., Pomeranz S, Siegal T. Gliomas following low-dose irradiation to the head report of three cases. *J. Neurooncol*. 1990; 8: 67 – 72.

<sup>23</sup> Ron E., Modan B., Boice J. D., Alfandary, Stovall M, Chetrit A E et al. Tumors of the brain and nervous system after radiotherapy in childhood. *N. Engl. J. Med*. 1988; 319: 1033 – 1039.

<sup>24</sup> Hardell L, Carlberg M, Söderqvist F, Mild K. Case-control study of the association between malignant brain tumours diagnosed between 2007 and 2009 and mobile and cordless phone use. *International Journal of Oncology*. 2013;43(6):1833-1845.

<sup>25</sup> Wrensch M, Minn Y, Chew T, Bondy M, Berger MS. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neuro Oncol* 2002;4(4):278-99.

- 
- <sup>26</sup> Wrensch M, Lee M, Miike R. Familial and personal medical history of cancer and nervous system conditions among adults with glioma and controls. *Am J Epidemiol* 1997;145(7):581-93.
- <sup>27</sup> Ohgaki, H., Olivier, M., and Hainaut, P. Li-Fraumeni syndrome and TP53 germline mutations, in WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. In: Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., and Cavenee, W. K. (eds.) IARC, Lyon, France. 2007; 222 – 225.
- <sup>28</sup> Cavenee, W. K., Burger, P. C., Leung, S. Y. Turcot syndrome, in WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. In: Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., and Cavenee, W. K. (eds.) IARC, Lyon, France. 2007; 229 – 231.
- <sup>29</sup> Von Deimling A. , Perry, A. Neurofibromatosis type 1, in WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. In: Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., and Cavenee, W. K. (eds.) IARC, Lyon, France. 2007; 206 – 209.
- <sup>30</sup> Lewis R. A., Gerson L. P., Axelson K. A. Von Recklinghausen neurofibromatosis. II. Incidence of optic glioma. *Ophthalmology*. 1984; 91: 929 – 935.
- <sup>31</sup> Stemmer-Rachamimov, A. O., Wiestler, O. D., and Louis, D. N. Neurofibromatosis type 2, in WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. In: Louis D. N., Ohgaki H., Wiestler O. D., and Cavenee W. K. (eds.) IARC, Lyon, France. 2003; 210 – 214.
- <sup>32</sup> Lamszus K., Lachenmayer L., Heinemann U. Molecular genetic alterations on chromosomes 11 and 22 in ependymomas. *Int. J. Cancer*. 2001; 91: 803 – 808.
- <sup>33</sup> Schlehofer B, Blettner M, Preston-Martin S, Niehoff D, Wahrendorf J, Arslan A et al. Role of medical history in brain tumour development. Results from the international adult brain tumour study. *Int. J. Cancer*. 1999; 82: 155 – 160.
- <sup>34</sup> Brenner AV, Linet MS, Fine HA, Shapiro WR, Selker RG, Black PM et al. History of allergies and autoimmune diseases and risk of brain tumors in adults. *Int. J. Cancer*. 2002; 99: 252 – 259.
- <sup>35</sup> Wiemels J. L., Wiencke J. K., Sison J. D., Miike R., McMillan A., and Wrensch M. History of allergies among adults with glioma and controls. *Int. J. Cancer*. 2002; 98: 609 – 615.
- <sup>36</sup> Schwartzbaum J, Jonsson F, Ahlbom A, Preston-Martin S, Lönn S, Söderberg KC et al. Cohort studies of association between self-reported allergic conditions, immune-related diagnoses and glioma and meningioma risk. *Int. J. Cancer*. 2003; 106: 423 – 428.
- <sup>37</sup> Wiemels JL, Wiencke JK, Patoka J, Moghadassi M, Chew T, McMillan A et al. Reduced immunoglobulin E and allergy among adults with glioma compared with controls. *Cancer Res*. 2004; 64: 8468 – 8473.
- <sup>38</sup> Hochberg F., Toniolo P., Cole P. Head trauma and seizures as risk factors of glioblastoma. *Neurology*. 1984; 34: 1511 – 1514.

- 
- <sup>39</sup> Hopton Cann SA, van Netten JP, van Netten C. Acute infections as a means of cancer prevention: opposing effects to chronic infections? *Cancer Detect Prev.* 2006; 30: 83 – 93.
- <sup>40</sup> Catalá-López F, Suárez-Pinilla M, Suárez-Pinilla P, Valderas JM, Gómez-Beneyto M, Martínez S. Et al. Inverse and direct cancer comorbidity in people with central nervous system disorders: a meta-analysis of cancer incidence in 577,013 participants of 50 observational studies. *Psychother Psychosom.* 2014;83(2).
- <sup>41</sup> Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK. World Health Organization histological classification of tumours of the central nervous system. International Agency for Research on Cancer, Lyon. 2007.
- <sup>42</sup> Louis DN, Perry A, Burger P, Ellison DW, Reifenberger G, von Deimling A, et al.; International Society Of Neuropathology--Haarlem. International Society Of Neuropathology—Haarlem consensus guidelines for nervous system tumor classification and grading. *Brain Pathol.* 2014 ;24(5):429-35.
- <sup>43</sup> Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016; 131(6):803-20.
- <sup>44</sup> Ohgaki H, Kleihues P . The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res* 2013; 19:764–772.
- <sup>45</sup> Perry A, Miller CR, Gujrati M, Scheithauer BW, Zambrano SC, Jost SC et al. Malignant gliomas with primitive neuroectodermal tumor-like components: a clinicopathologic and genetic study of 53 cases. *Brain Pathol.* 2009; 19:81–90.
- <sup>46</sup> Louis DN, von Deimling A, Chung RY. Comparative study of p53 gene and protein alterations in human astrocytic tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 1993;52(1):31-8.
- <sup>47</sup> Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med.* 2009; 360(8):765-73.
- <sup>48</sup> Brat DJ, Verhaak RG, Aldape KD, Yung WK, Salama SR, Cooper LA et al. Cancer Genome Atlas Research Network, Comprehensive, integrative genomic analysis of diffuse lower-grade gliomas. *N Engl J Med.* 2015; 372:2481–2498.
- <sup>49</sup> Huse JT, Diamond EL, Wang L, Rosenblum MK. Mixed glioma with molecular features of composite oligodendroglioma and astrocytoma: a true "oligoastrocytoma"? *Acta Neuropathol.* 2015; 129(1):151-3.
- <sup>50</sup> Wilcox P, Li CC, Lee M, Shivalingam B, Brennan J, Suter CM et al. Oligoastrocytomas: throwing the baby out with the bathwater? *Acta Neuropathol.* 2015; 129:147–149.

- 
- <sup>51</sup> Korshunov A, Ryzhova M, Hovestadt V, Bender S, Sturm D, Capper D et al. Integrated analysis of pediatric glioblastoma reveals a subset of biologically favorable tumors with associated molecular prognostic markers. *Acta Neuropathol.* 2015;129:669–678.
- <sup>52</sup> Ramkissoon LA, Horowitz PM, Craig JM, Ramkissoon SH, Rich BE, Schumacher SE, et al. Genomic analysis of diffuse pediatric low-grade gliomas identifies recurrent oncogenic truncating rearrangements in the transcription factor MYBL1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013; 110:8188–8193.
- <sup>53</sup> Zhang J, Wu G, Miller CP, Tatevossian RG, Dalton JD, Tang B et al. Whole-genome sequencing identifies genetic alterations in pediatric low-grade gliomas. *Nat Genet.* 2013; 45:602–612.
- <sup>54</sup> van den Bent MJ, Weller M, Wen PY, Kros JM, Aldape K, Chang S. A clinical perspective on the 2016 WHO brain tumor classification and routine molecular diagnostics. *Neuro Oncol.* 2017; 1;19(5):614-624.
- <sup>55</sup> Alss J, Meyer J, Mueller W. Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol.* 2008;116(6):597–602.
- <sup>56</sup> Hartmann C, Meyer J, Balss J, Capper D, Mueller W, Christians A et al. Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas. *Acta Neuropathol.* 2009;118(4):469-74.
- <sup>57</sup> Korshunov A, Ryzhova M, Hovestadt V, Bender S, Sturm D, Capper D et al. Integrated analysis of pediatric glioblastoma reveals a subset of biologically favorable tumors with associated molecular prognostic markers. *Acta Neuropathol.* 2015;129(5):669-78.
- <sup>58</sup> Lu C, Ward PS, Kapoor GS, Rohle D, Turcan S, Abdel-Wahab O et al. IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature.* 2012 Feb 15;483(7390):474-8.
- <sup>59</sup> Wang P, Wu J, Ma S, Zhang L, Yao J, Hoadley KA et al. Oncometabolite D-2-Hydroxyglutarate Inhibits ALKBH DNA Repair Enzymes and Sensitizes IDH Mutant Cells to Alkylating Agents. *Cell Rep.* 2015;13(11):2353-2361.
- <sup>60</sup> Cairncross JG, Wang M, Jenkins RB. Benefit from procarbazine, lomustine, and vincristine in oligodendroglial tumors is associated with mutation of IDH. *J Clin Oncol.* 2014;32(8):783–790.
- <sup>61</sup> Reifenberger J, Reifenberger G, Liu L, James CD, Wechsler W, Collins VP. Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p. *Am J Pathol.* 1994;145(5):1175-90.

- 
- <sup>62</sup> Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC. Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90(19):1473–1479.
- <sup>63</sup> Cairncross G, Berkey B, Shaw E, Jenkins R, Scheithauer B, Brachman D et al. Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402, Phase III trial of chemotherapy plus radiotherapy compared with radiotherapy alone for pure and mixed anaplastic oligodendroglioma: Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402. *J Clin Oncol.* 2006;24(18):2707-14.
- <sup>64</sup> Dubbink HJ, Atmodimedjo PN, Kros JM. Molecular classification of anaplastic oligodendroglioma using next-generation sequencing: a report of the prospective randomized EORTC Brain Tumor Group 26951 phase III trial. *Neuro Oncol.* 2016;18(3):388–400.
- <sup>65</sup> Wang XW, Ciccarino P, Rossetto M, Boisselier B, Marie Y, Desestret V et al. IDH mutations: genotype-phenotype correlation and prognostic impact. *Biomed Res Int.* 2014;2014:540236.
- <sup>66</sup> Labussière M, Di Stefano AL, Gleize V. TERT promoter mutations in gliomas, genetic associations and clinico-pathological correlations. *Br J Cancer.* 2014;111(10):2024–2032.
- <sup>67</sup> Eckel-Passow JE, Lachance DH, Molinaro AM, Walsh KM, Decker PA, Sicotte H et al. Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors. *N Engl J Med.* 2015;372(26):2499-508.
- <sup>68</sup> Weller M, Weber RG, Willscher E. Molecular classification of diffuse cerebral WHO grade II/III gliomas using genome- and transcriptome-wide profiling improves stratification of prognostically distinct patient groups. *Acta Neuropathol.* 2015;129(5):679–693.
- <sup>69</sup> Ozawa T, Riester M, Cheng YK, Huse JT, Squatrito M, Helmy K et al. Most human non-GCIMP glioblastoma subtypes evolve from a common proneural-like precursor glioma. *Cancer Cell.* 2014 Aug 11;26(2):288-300.
- <sup>70</sup> Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol.* 2007 May;170(5):1445-53.
- <sup>71</sup> Riemenschneider MJ, Jeuken JW, Wesseling P, Reifenberger G. Molecular diagnostics of gliomas: state of the art. *Acta Neuropathol.* 2010 Nov;120(5):567-84.
- <sup>72</sup> Osborn, Salzman, Barkovich. Diagnóstico por imagen cerebro. Segunda edición. España. Marban SL; 2010. ISBN: 978-84-7101-720-8.
- <sup>73</sup> Al-Okaili RN, Krejza J, Wang S, Woo JH, Melhem ER. Advanced MR imaging techniques in the diagnosis of intraaxial brain tumors in adults. *Radiographics.* 2006 (1): 173-89. Review.

- 
- <sup>74</sup> Lam WW, Poon WS, Metreweli C. DiffusionMR imaging in glioma: does it have any role in the pre- operation determination of grading of glioma? *Clin Radiol* 2002;57(3):219–225.
- <sup>75</sup> Gupta A,Shah A,Young RJ,Holodny A.I. Imaging of brain tumors: functional magnetic resonance imaging and diffusion tensor imaging. *Neuroimaging Clin N Am.* 2010; 20 379-400.
- <sup>76</sup> Arbizu J, Domínguez PD, Diez-Valle R, Vigil C, García-Eulate R, Zubieta JL et al. Neuroimaging in brain tumors. *Rev Esp Med Nucl.* 2011; 30(1):47-65.
- <sup>77</sup> Thompson G,Mills SJ,Stivaros SM, Jackson A. Imaging of brain tumors: perfusion/permeability. *Neuroimaging Clin N Am.* 2010; 20:337-353.
- <sup>78</sup> Law M, Yang S, Wang H, Babb JS, Johnson G, Cha S et al. Glioma grading: sensitivity, specificity, and predictive values of perfusion MR imaging and proton MR spectroscopic imaging compared with conventional MR imaging. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2003; (10):1989-98.
- <sup>79</sup> Aronen HJ, Pardo FS, Kennedy DN. High microvascular blood volume is associated with high glucose uptake and tumor angiogenesis in human gliomas. *Clin Cancer Res*2000; 6(6): 2189–2200.
- <sup>80</sup> H J Aronen, I E Gazit, D N Louis, B R Buchbinder, F S Pardo, R M Weisskoff et al. Cerebral blood volume maps of gliomas: comparison with tumor grade and histologic findings. *Radiology* 1994; 191(1):41-51.
- <sup>81</sup> Horsk A,Barker P.B. Imaging of brain tumors: MR spectroscopy and metabolic imaging. *Neuroimaging Clin N Am.* 2010;20:293-310.
- <sup>82</sup> Buckner JC. Factors influencing survival in high-grade gliomas. *Semin Oncol.* 2003; 10-4.
- <sup>83</sup> Daumas-Duport, C., B. Scheithauer. Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method. *Cancer* 1988; 62(10): 2152-65.
- <sup>84</sup> Karnofsky DA, Burchenal JH., Armistead JR., Southam CM., Bernstein JL, Craver Lf et al. Triethylene melamine in the treatment of neoplastic disease; a compound with nitrogen-mustardlike activity suitable for oral and intravenous use. *Ama Arch Intern Med.* 1951;87(4):477-516.
- <sup>85</sup> Chaichana KL, Zadnik P, Weingart JD, Olivi A, Gallia GL, Blakeley J. Multiple resections for patients with glioblastoma: prolonging survival. *Journal of neurosurgery.* 2013 Apr;118(4):812–20.
- <sup>86</sup> Iacob G, Dinca EB. Current data and strategy in glioblastoma multiforme. *J Med Life.* 2009;2(4):386-93.



- 
- <sup>87</sup> Simpson JR, Horton J, Scott C, Curran WJ, Rubin P, Fischbach J et al. Influence of location and extent of surgical resection on survival of patients with glioblastoma multiforme: results of three consecutive Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) clinical trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1993;26(2):239-44.
- <sup>88</sup> Fine HA, Dear KB, Loeffler JS, Black PM, Canellos GP. Meta-analysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults. *Cancer.* 1993;71(8):2585-97.
- <sup>89</sup> Stewart LA. Chemotherapy in adult high-grade glioma: A systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. *Lancet* 2002; 359:1011-1018.
- <sup>90</sup> Marchesi, F., M. Turriziani. Triazene compounds: mechanism of action and related DNA repair systems. *Pharmacol Res;* 2007 56(4): 275-87.
- <sup>91</sup> Weller M, Pfister SM, Wick W, Hegi ME, Reifenberger G, Stupp R. Review molecular neuro-oncology in clinical practice: a new horizon. *Lancet Oncology.* Elsevier Ltd; 2013;14(9):370–9.
- <sup>92</sup> McDonald KL, Aw G, Kleihues P. Role of Biomarkers in the Clinical Management of Glioblastomas: What are the Barriers and How Can We Overcome Them? *Frontiers in neurology.* 2012;3:188.
- <sup>93</sup> Stupp R, Brada M, van den Bent MJ, Tonn JC, Pentheroudakis G; ESMO Guidelines Working Group. High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2014;(3)93-101.
- <sup>94</sup> Malmström A, Grønberg BH, Marosi C. Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012; 13: 916–926.
- <sup>95</sup> Wick W, Platten M, Meisner C. Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012; 13: 707–715.
- <sup>96</sup> Sanson M, Marie Y, Paris S. Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *J Clin Oncol* 2009; 27: 4150–4154.
- <sup>97</sup> Walker MD, Alexander E Jr, Hunt WE, MacCarty CS, Mahaley MS Jr, Mealey J Jr, et al. Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial. *J Neurosurg.* 1978;49(3):333-43.
- <sup>98</sup> Westphal M, Hilt DC, Bortey E, Delavault P, Olivares R, Warnke PC et al. A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro Oncol.* 2003(2):79-88.

- 
- <sup>99</sup> Stupp R, Hegi ME, Mason WP. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 2009;10(5):459-66.
- <sup>100</sup> Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352: 997–1003.
- <sup>101</sup> Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ et al; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352(10):987-96.
- <sup>102</sup> Roa W, Brasher PM, Bauman G, Anthes M, Bruera E, Chan A et al. Abbreviated course of radiation therapy in older patients with glioblastoma multiforme: a prospective randomized clinical trial. *J Clin Oncol.* 2004;22(9):1583-8.
- <sup>103</sup> Balana C, Lopez-Pousa A, Berrocal A. Phase II study of temozolamide and cisplatin as primary treatment prior to radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma multiforme patients with measurable disease. A study of the Spanish Medical Neurology Group (GENOM). *J Neuro-Oncology* 2004; 70:359-369.
- <sup>104</sup> Chiang L, Hsieh T, Chiu M, Liu G, Kuo Y, Lin W-C. Distinction between pyogenic brain abscess and necrotic brain tumour using 3-tesla MR spectroscopy, diffusion and perfusion imaging. *The british journal of Radiology.* 2009;82:813–20.
- <sup>105</sup> Lemée JM, Clavreul A, Menei P. Intratumoral heterogeneity in glioblastoma: don't forget the peritumoral brain zone. *Neuro Oncol.* 2015; (10):1322-32.
- <sup>106</sup> Engelhorn T, Savaskan NE, Schwarz MA, Kreutzer J, Meyer EP, Hahnen E et al. Cellular characterization of the peritumoral edema zone in malignant brain tumors. *Cancer Sci.* 2009;100(10):1856-62.
- <sup>107</sup> Osta WA, Chen Y, Mikhitarian K, Mitas M, Salem M, Hannun YA et al. EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy. *Cancer Res.* 2004;64(16):5818-24.
- <sup>108</sup> Aubry M, de Tayrac M, Etcheverry A, Clavreul A, Saikali S, Menei P et al. From the core to beyond the margin: a genomic picture of glioblastoma intratumor heterogeneity. *Oncotarget.* 2015;6(14):12094-109. Erratum in: *Oncotarget.* 2016 Oct 11;7(41):67685.
- <sup>109</sup> Burger PC, Scheithauer BW. Tumors of the central nervous system. *AFIP Atlas of Tumor Pathology.* Washington, D.C.: American Registry of Pathology Press; 2007.

- 
- <sup>110</sup> Farin A, Suzuki SO, Weiker M, Goldman JE, Bruce JN, Canoll P. Transplanted glioma cells migrate and proliferate on host brain vasculature: a dynamic analysis. *Glia*. 2006; 53:799-808.
- <sup>111</sup> Bergers G, Song S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol*. 2005; 7:452-464.
- <sup>112</sup> Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 2011; 473:298-307. 12.
- <sup>113</sup> Pombero A, Garcia-Lopez R, Martinez S. Brain mesenchymal stem cells: physiology and pathological implications. *Dev Growth Differ*. 2016; (5):469-80.
- <sup>114</sup> Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*. 1971; 285:1182–1186.
- <sup>115</sup> M.D. Brooks, R. Sengupta, S.C. Snyder, J.B. Rubin. Hitting Them Where They Live: Targeting the Glioblastoma Perivascular Stem Cell Niche, *Curr. Pathobiol*. 2013; 101-110.
- <sup>116</sup> Hambardzumyan D, Bergers G. Glioblastoma: Defining Tumor Niches. *Trends Cancer*. 2015; (4):252-265.
- <sup>117</sup> Stallcup, W.B. The NG2 proteoglycan: Past insights and future prospects. *J. Neurocytol*. 2002; 31, 423–435.
- <sup>118</sup> Peppiatt CM, Howarth C, Mobbs P, Attwell D. Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature*. 2006; 443:700-704.
- <sup>119</sup> Rucker, H.K., Wynder, H.J., and Thomas, W.E. Cellular mechanisms of CNS pericytes. *Brain Res. Bull*. 2000; 51, 363–369.
- <sup>120</sup> Balabanov R, Washington R, Wagnerova J, Dore-Duffy P. CNS microvascular pericytes express macrophage-like function, cell surface integrin alpha M, and macrophage marker ED-2. *Microvasc Res*. 1996; 52:127-142.
- <sup>121</sup> Thomas WE. Brain macrophages: on the role of pericytes and perivascular cells. *Brain Res Brain Res Rev*. 1999; 31:42-57. 15.
- <sup>122</sup> Caspani EM, Crossley PH, Redondo-Garcia C, Martinez S. Glioblastoma: a pathogenic crosstalk between tumor cells and pericytes. *PLoS One*. 2014; 9(7):e101402.
- <sup>123</sup> Da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2008; 26:2287-2299. 16.
- <sup>124</sup> Bao S, Wu Q, Sathornsumetee S, Hao Y, Li Z, Hjelmeland AB et al. Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res*. 2006b; 66:7843–7848.

- 
- <sup>125</sup> Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, Hogg TL, Fuller C, Hamner B et al. A Perivascular Niche for Brain Tumor Stem Cells. *Cancer Cell*. 2007; 11:69–82.
- <sup>126</sup> Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M, Todaro M, Invernici G, Cenci T et al. Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature*. 2010; 468:824–828.
- <sup>127</sup> Soda Y, Marumoto T, Friedmann-Morvinski D, Soda M, Liu F, Michiue H et al. Transdifferentiation of glioblastoma cells into vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108:4274–4280.
- <sup>128</sup> Wang R, Chadalavada K, Wilshire J, Kowalik U, Hovinga KE, Geber A et al. Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature*. 2010; 468:829–833.
- <sup>129</sup> Kulla A, Burkhardt K, Meyer-Puttitz B, Teesalu T, Asser T, Wiestler OD et al. Analysis of the TP53 gene in laser-microdissected glioblastoma vasculature. *Acta Neuropathol*. 2003; 105:328–332.
- <sup>130</sup> Rodriguez FJ, Orr BA, Ligon KL, Eberhart CG. Neoplastic cells are a rare component in human glioblastoma microvasculature. *Oncotarget*. 2012; 3:98–106.
- <sup>131</sup> De Carvalho AC, Nelson K, Lemke N, Lehman NL, Arbab AS, Kalkanis S. Et al. Gliosarcoma stem cells undergo glial and mesenchymal differentiation in vivo. *Stem Cells*. 2010; 28:181–190.
- <sup>132</sup> Ricci-Vitiani L, Pallini R, Larocca LM, Lombardi DG, Signore M, Pierconti F et al. Mesenchymal differentiation of glioblastoma stem cells. *Cell Death Differ*. 2008; 15:1491–1498.
- <sup>133</sup> Ii M, Nishimura H, Sekiguchi H, Kamei N, Yokoyama A, Horii M et al. Concurrent vasculogenesis and neurogenesis from adult neural stem cells. *Circ Res*. 2009; 105:860–868.
- <sup>134</sup> Morishita R, Nagata K, Ito H, Ueda H, Asano M, Shinohara H et al. Expression of smooth muscle cell-specific proteins in neural progenitor cells induced by agonists of G protein-coupled receptors and transforming growth factor-beta. *J. Neurochem*. 2007; 101:1031–1040.
- <sup>135</sup> Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. 2008; 3:301–313.
- <sup>136</sup> Cheng L, Huang Z, Zhou W, Wu Q, Donnola S, et al. Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. *Cell* 2013; 153: 139–152.

- 
- <sup>137</sup> Hanahan, D., Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144:646–674.
- <sup>138</sup> Pezzella F., B. A. Di, S. Andreola, A. G. Nicholson, U. Pastorino, A. L. Harris. Angiogenesis in primary lung cancer and lung secondaries. *Eur. J. Cancer* 1996; 32A:2494–2500.
- <sup>139</sup> Pezzella F., U. Pastorino E. Tagliabue S. Andreola G. Sozzi, G. Gasparini. Non-small-cell lung carcinoma tumor growth without morphological evidence of neo-angiogenesis. *Am. J. Pathol.* 1997; 151:1417–1423.
- <sup>140</sup> Passalidou E., M. Stewart, M. Trivella, G. Steers, G. Pillai, A. Dogan. Vascular patterns in reactive lymphoid tissue and in non-Hodgkin's lymphoma. *Br. J. Cancer* 2003; 88:553–559.
- <sup>141</sup> Wesseling P., J. A. van der Laak, L. H. de Leeuw, D. J. Ruiter, P. C. Burger. Quantitative immunohistological analysis of the microvasculature in untreated human glioblastoma multiforme. Computer-assisted image analysis of whole-tumor sections. *J. Neurosurg.* 1994; 81:902–909.
- <sup>142</sup> Sardari N. P., J. Hendriks, G. Friedel, S. P. Van, M. E. Van. Distinct angiogenic and non-angiogenic growth patterns of lung metastases from renal cell carcinoma. *Histopathology* 2007; 51:354–361.
- <sup>143</sup> Stessels F., G. Van den Eynden, I. Van der Auwera, R. Salgado, E. Van den Heuvel, A. L. Harris. Breast adenocarcinoma liver metastases, in contrast to colorectal cancer liver metastases, display a non-angiogenic growth pattern that preserves the stroma and lacks hypoxia. *Br. J. Cancer.* 2004; 90:1429–1436.
- <sup>144</sup> Van den Eynden G. G., N. C. Bird, A. W. Majeed, L. S. Van, L. Y. Dirix, P. B. Vermeulen. The histological growth pattern of colorectal cancer liver metastases has prognostic value. *Clin. Exp. Metastasis.* 2012; 29:541–549.
- <sup>145</sup> Vermeulen P. B., C. Colpaert, R. Salgado, R. Royers, H. Hellemans, E. Van den Heuvel. Liver metastases from colorectal adenocarcinomas grow in three patterns with different angiogenesis and desmoplasia. *J. Pathol.* 2001; 195:336–342.
- <sup>146</sup> Naresh K. N., A. Y. Nerurkar, A. M. Borges. Angiogenesis is redundant for tumour growth in lymph node metastases. *Histopathology.* 2001; 38:466–470.
- <sup>147</sup> Donnem T, Hu J, Ferguson M, Adighibe O, Snell C. Vessel co- option in primary human tumors and metastasis: an obstacle to effective anti- angiogenic treatment? *Cancer Med.* 2013; 2: 427–436. 7.
- <sup>148</sup> Bergers G, Song S, Meyer-Morse N, Bergsland E, Hanahan D. Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J. Clin. Invest.* 2003; 111:1287– 1295.

- 
- <sup>149</sup> Franco M, Roswall P, Cortez E, Hanahan D, Pietras K. Pericytes promote endothelial cell survival through induction of autocrine VEGF-A signaling and Bcl-w expression. *Blood*. 2011; 118:2906–2917.
- <sup>150</sup> Morikawa S, Baluk P, Kaidoh T, Haskell A, Jain RK, McDonald DM. Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am. J. Pathol.* 2002; 160:985–1000.
- <sup>151</sup> Winkler EA, Bell RD, Zlokovic BV. Central nervous system pericytes in health and disease. *Nat Neurosci.* 2011; 14:1398–1405.
- <sup>152</sup> Ochs K, Sahm F, Opitz CA, Lanz TV, Oezen I. Immature mesenchymal stem cell-like pericytes as mediators of immunosuppression in human malignant glioma. *J Neuroimmunol.* 2013;265: 106–116.
- <sup>153</sup> Balabanov R, Beaumont T, Dore-Duffy P. Role of central nervous system microvascular pericytes in activation of antigen-primed splenic T-lymphocytes. *J Neurosci Res.* 1999; 55:578-587.
- <sup>154</sup> Domev H, Milkov I, Itskovitz-Eldor J, Dar A. Immuno-evasive pericytes from human pluripotent stem cells preferentially modulate induction of allogeneic regulatory T cells. *Stem Cells Transl Med.* 2014; 3:1169-1181.
- <sup>155</sup> Bose A, Barik S, Banerjee S, Ghosh T, Mallick A, Bhattacharyya Majumdar S et al. Tumor-derived vascular pericytes anergize Th cells. *J Immunol.* 2013; 191:971-981.
- <sup>156</sup> Valdor R, García-Bernal D, Bueno C, Ródenas M, Moraleda JM, Macian F et al. Glioblastoma progression is assisted by induction of immunosuppressive function of pericytes through interaction with tumor cells. *Oncotarget.* 2017;8(40):68614-68626.
- <sup>157</sup> Oh J, Henry RG, Pirzkall A, Lu Y, Li X, Catalaa I et al. Survival analysis in patients with glioblastoma multiforme: predictive value of choline-to-N-acetylaspartate index, apparent diffusion coefficient, and relative cerebral blood volume. *J Magn Reson Imaging.* 2004; (5):546-54.
- <sup>158</sup> JM, Cha S, Chang SM, Nelson SJ. Dynamic susceptibility-weighted perfusion imaging of high-grade gliomas: characterization of spatial heterogeneity. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2005; (6):1446-54.
- <sup>159</sup> Server A, Kulle B, Maehlen J, Josefsen R, Schellhorn T, Kumar T et al. Quantitative apparent diffusion coefficients in the characterization of brain tumors and associated peritumoral edema. *Acta Radiol.* 2009;50(6):682-9.
- <sup>160</sup> Shankar JJ, Bata A, Ritchie K, Hebb A, Walling S. Normalized Apparent Diffusion Coefficient in the Prognostication of Patients with Glioblastoma Multiforme. *Can J Neurol Sci.* 2016;43(1):127-33.

- 
- <sup>161</sup> Castillo M, Smith JK, Kwock L, Wilber K. Apparent diffusion coefficients in the evaluation of high-grade cerebral gliomas. *AJNR Am J Neuroradiol* 2001;22(1):60—4.
- <sup>162</sup> Catalaa I, Henry R, Dillon WP, Graves EE, McKnight TR, Lu Y et al. Perfusion, difusión and spectroscopy values in newly diagnosed cerebral gliomas. *NMR Biomed.* 2006; 19 (4): 463-75.
- <sup>163</sup> Eis M, Els T, Hoehn-Berlage M, Hossmann KA. Quantitative diffusion MR imaging of cerebral tumor and edema. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 1994;60:344—6.
- <sup>164</sup> Guzman R, Altrichter S, El-Koussy M, Gralla J, Weis J, Barth A et al. Contribution of the apparent diffusion coefficient in perilesional edema for the assessment of brain tumors. *J Neuroradiol.* 2008;35(4):224-9.
- <sup>165</sup> Deng Z, Yan Y, Zhong D, Yang G, Tang W, Lu F et al. Quantitative analysis of glioma cell invasion by diffusion tensor imaging. *J Clin Neurosci* 2010;17(12):1530-6.
- <sup>166</sup> Sinha S, Bastin ME, Whittle IR, Wardlaw JM. Diffusion tensor MR imaging of high-grade cerebral gliomas. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2002;23(4):520-7.
- <sup>167</sup> Beppu T, Inoue T, Shibata Y. Measurement of fractional anisotropy using diffusion tensor MRI in supratentorial astrocytic tumors. *J Neurooncol* 2003;6:109-16.
- <sup>168</sup> Toh CH, Castillo M, Wong AM. Primary cerebral lymphoma and glioblastoma multiforme: differences in diffusion characteristics evaluated with diffusion tensor imaging. *AJNR Am J Neuroradiol* 2008;29:471-5.
- <sup>169</sup> Stadlbauer A, Ganslandt O, Buslei R. Gliomas: histopathologic evaluation of changes in directionality and magnitude of water diffusion at diffusion-tensor MR imaging. *Radiology* 2006;240:803-10.
- <sup>170</sup> Saksena S, Jain R, Narang J, Scarpace L, Schultz LR, Lehman NL et al. Predicting survival in glioblastomas using diffusion tensor imaging metrics. *J Magn Reson Imaging* 2010;32(4):788-95.
- <sup>171</sup> Zikou AK, Alexiou GA, Kosta P, Goussia A, Astrakas L, Tsekeris P et al. Diffusion tensor and dynamic susceptibility contrast MRI in glioblastoma. *Clinical neurology and neurosurgery* 2012;114(6):607-12.
- <sup>172</sup> Huber T, Bette S, Wiestler B, Gempt J, Gerhardt J, Delbridge C, Barz M, Meyer B, Zimmer C, Kirschke JS. Fractional Anisotropy Correlates with Overall Survival in Glioblastoma. *World Neurosurg.* 2016;95:525-534.
- <sup>173</sup> Price SJ, Young AM, Scotton WJ. Multimodal MRI can identify perfusion and metabolic changes in the invasive margin of glioblastomas. *J Magn Reson Imaging* 2016;43(2):487—494.

- 
- <sup>174</sup> Mohsen LA, Shi V, Jena R, Gillard JH, Price SJ. Diffusion tensor invasive phenotypes can predict progression-free survival in glioblastomas. *Br J Neurosurg* 2013;27:419–424.
- <sup>175</sup> Price S, Pena A, Burnet N, Pickard J, Gillard J. Detecting glioma invasion of the corpus callosum using diffusion tensor imaging. *Br J Neurosurg* 2004;18:391–395.
- <sup>176</sup> Chang EL, Akyurek S, Avalos T. Evaluation of peritumoral edema in the delineation of radiotherapy clinical target volumes for glioblastoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;68:144–150.
- <sup>177</sup> Law M, Yang S, Babb JS, Knopp EA, Golfinos JG, Zagzag D. Comparison of cerebral blood volume and vascular permeability from dynamic susceptibility contrast-enhanced perfusion MR imaging with glioma grade. *Am J Neuroradiol* 2004;25:746–55.
- <sup>178</sup> Law M, Young RJ, Babb JS, Peccerelli N, Chheang S, Gruber ML. Gliomas: predicting time to progression or survival with cerebral blood volume measurements at dynamic susceptibility-weighted contrast-enhanced perfusion MR imaging. *Radiology* 2008;247:490–8.
- <sup>179</sup> Mills SJ, Patankar TA, Haroon HA, Balériaux D, Swindell R, Jackson A. Do cerebral blood volume and contrast transfer coefficient predict prognosis in human glioma. *Am J Neuroradiol* 2006;27:853–8.
- <sup>180</sup> Sadeghi N, D’Haene N, Decaestecker C, Levivier M, Metens T, Maris C. Apparent diffusion coefficient and cerebral blood volume in brain gliomas: relation to tumor cell density and tumor microvessel density based on stereotactic biopsies. *Am J Neuroradiol* 2008;29:476–82.
- <sup>181</sup> Lee EJ, Ahn KJ, Lee EK, Lee YS, Kim DB. Potential role of advanced MRI techniques for the peritumoral region in differentiating glioblastoma multiforme and solitary metastatic lesions. *Clin Radiol*. 2013;68(12):e689-97.
- <sup>182</sup> Blasel S, Franz K, Ackermann H, Weidauer S, Zanella F, Hattingen E. Stripe-like increase of rCBV beyond the visible border of glioblastomas: site of tumor infiltration growing after neurosurgery. *J Neurooncol* 2011;103:575–584.
- <sup>183</sup> Ott D, Henning J, Ernest T. Human brain tumors: assessment with in vivo proton MR spectroscopy. *Radiology* 1993;186:745–52.
- <sup>184</sup> Butzen J, Prost R, Chetty V, Donahue K, Nepl R, Li S-J, et al. Discrimination between neoplastic and nonneoplastic brain lesions by use of proton MR spectroscopy: the limits of accuracy with a logistic regression model. *AJNR Am J Neuroradiol* 2000;21(7):1213–9.
- <sup>185</sup> Law M, Cha S, Knopp EA, Jhonson G, Arnett J, Litt AW. High-grade gliomas and solitary metastases: differentiation by using perfusion and proton spectroscopic MR imaging. *Radiology* 2002;222:715-21.



- 
- <sup>186</sup> Fan G, Sun B, Wu Z, Guo Q, Guo Y. In vivo single-voxel proton MR spectroscopy in the differentiation of high-grade gliomas and solitary metastases. *Clin Radiol* 2004;59:77-85.
- <sup>187</sup> Roldan-Valadez E, Rios C, Motola-Kuba D, Matus-Santos J, Villa AR, Moreno-Jimenez S. Choline-to-N-acetyl aspartate and lipids-lactate-to-creatine ratios together with age assemble a significant Cox's proportional-hazards regression model for prediction of survival in high-grade gliomas. *Br J Radiol*.2016;89:1067.
- <sup>188</sup> Herholz K, Heindel W, Luyten PR. , denHollander JA, Pietrzyk U, Voges J et al. In vivo imaging of glucose consumption and lactate concentration in human gliomas. *Ann Neurol* 1992;31:319–327.
- <sup>189</sup> Remy C, Foulhe N, Barba I. , Sam-Lai E, Lahrech H, Cucurella MG et al. Evidence that mobile lipids detected in rat brain glioma by 1H nuclear magnetic resonance correspond to lipid droplets. *Cancer Res* 1997;57:407–414.
- <sup>190</sup> Li Y, JM, Parvataneni R, Lamborn KR, Cha S, Chang SM, Nelson SJ. Survival analysis in patients with newly diagnosed glioblastoma using pre- and postradiotherapy MR spectroscopic imaging. *Neuro Oncol*. 2013 May;15(5):607-17.
- <sup>191</sup> Saraswathy S, Crawford FW, Lamborn KR, Pirzkall A, Chang S, Cha S et al. Evaluation of MR markers that predict survival in patients with newly diagnosed GBM prior to adjuvant therapy. *J Neurooncol*. 2009;91(1):69-81.
- <sup>192</sup> Eng LF, Vanderhaeghen JJ, Bignami A, Gerstl B. An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res*. 1971; 28: 351–4.
- <sup>193</sup> Jung CS, Foerch C, Schänzer A, Heck A, Plate KH, Seifert V et al. Serum GFAP is a diagnostic marker for glioblastoma multiforme. *Brain*. 2007;130(Pt 12):3336-41.
- <sup>194</sup> Tichy J, Spechtmeyer S, Mittelbronn M, Hattingen E, Rieger J, Senft C et al. Prospective evaluation of serum glial fibrillary acidic protein (GFAP) as a diagnostic marker for glioblastoma. *J Neurooncol*. 2016;126(2):361-9.
- <sup>195</sup> Law M, Cha S, Knopp EA. High-grade gliomas and solitary metastases: differentiation by using perfusion and proton spectroscopic MR imaging. *Radiology* 2002;222:715-21.
- <sup>196</sup> Al-Mayhany MT, Grenfell R, Narita M, Piccirillo S, Kenney-Herbert E, Fawcett JW et al. NG2 expression in glioblastoma identifies an actively proliferating population with an aggressive molecular signature. *Neuro-oncology*. 2011; 13:830–845.
- <sup>197</sup> Stallcup WB, You WK, Kucharova K, Cejudo-Martin P, Yotsumoto F. NG2 Proteoglycan-Dependent Contributions of Pericytes and Macrophages to Brain Tumor Vascularization and Progression. *Microcirculation*. 2016; 122-33.
- <sup>198</sup> Mignogna C, Signorelli F , Vismara MF, Zeppa P, Camastra C, Barni T, Donato G et al.

---

A reappraisal of macrophage polarization in glioblastoma: histopathological and immunohistochemical findings and review of the literature, *Pathology - Research and Practice* 2016;6:491-9.

<sup>199</sup> Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*. 2010 ;141(1):39-51.

<sup>200</sup> Chen J, Mao S, Li H, Zheng M, Yi L, Lin JM et al. The pathological structure of the perivascular niche in different microvascular patterns of glioblastoma. *PLoS One*. 2017;12(8).

<sup>201</sup> Pope W, Sayre J, Perlina A, Villablanca JP, Mischel PS, Cloughesy TF. MR imaging correlates of survival in patients with high-grade gliomas. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2005; 26:2466–2474.

<sup>202</sup> Piccolo SR, Frey LJ. Clinical and molecular models of glioblastoma multiforme survival. *Int J Data Min Bioinform*. 2013;7(3):245-65.

<sup>203</sup> Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69: 89–95.

<sup>204</sup> G. Çoban, S. Mohan, F. Kural, S. Wang, D.M. O'Rourke, H. Poptani. Prognostic Value of Dynamic Susceptibility Contrast-Enhanced and Diffusion-Weighted MR Imaging in Patients with Glioblastomas *American Journal of Neuroradiology AJNR*. 2015;36 (7) 1247-1252.

<sup>205</sup> Wu CX, Lin GS, Lin ZX, Zhang JD, Liu SY, Zhou CF. Peritumoral edema shown by MRI predicts poor clinical outcome in glioblastoma. *World J Surg Oncol*. 2015; 11;13:97. PMID: 25886608.

<sup>206</sup> Murakami R, Sugahara T, Nakamura H, Hirai T, Kitajima M, Hayashida Y et al. Malignant supratentorial astrocytoma treated with postoperative radiation therapy: prognostic value of pretreatment quantitative diffusion-weighted MR imaging. *Radiology*. 2007; 243(2):493–499.

<sup>207</sup> Yamasaki F, Sugiyama K, Ohtaki M, Takeshima Y, Abe N, Akiyama Y et al. Glioblastoma treated with postoperative radio- chemotherapy: prognostic value of apparent diffusion coefficient at MR imaging. *Eur J Radiol*. 2010; 73(3):532–537.

<sup>208</sup> Qin L, Li A, Qu J, Reinshagen K, Li X, Cheng SC et al. Normalization of ADC does not improve correlation with overall survival in patients with high-grade glioma (HGG). *J Neurooncol*. 2018;137(2):313-319.

<sup>209</sup> Jeremic B, Milicic B, Grujicic D, Dagovic A, Aleksandrovic J, Nikolic N. Clinical prognostic factors in patients with malignant glioma treated with combined modality approach. *Am J Clin Oncol* 2004; 27: 195–204.

<sup>210</sup> Tsidulko AY, Kazanskaya GM, Kostromskaya DV, Aidagulova SV, Kiselev RS, Volkov

---

AM et al. Prognostic relevance of NG2/CSPG4, CD44 and Ki-67 in patients with glioblastoma. *Tumour Biol.* 2017;39(9):1010428317724282.

