



Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas

Opción Biología Celular y Molecular

Oligodendrogliomas humanos: caracterización molecular y análisis de la activación de la vía de TGF- β en relación a la progresión tumoral

Doctor en Medicina Francisco José Garagorry Guerra

Directora de tesis: Dra. Silvia Olivera-Bravo

Codirectores Dra. Carmen Bolatto

Dr. Dardo Centurión

Tribunal Dra. Anabel Fernandez (Presidente)

Dr. Gabriel Anesetti (Vocal)

Dr. Rafael De Armas (Vocal)

Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de
Investigaciones Biológicas Clemente Estable / Cátedra y Departamento de
Anatomía Patológica Hospital de Clínicas Dr. Manuel Quintela

Montevideo, Diciembre de 2020

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo lo pude realizar gracias al aporte de múltiples personas a las cuales agradezco profundamente y sé que se sentirán aludidas si no se encuentran plasmadas en este limitado apartado. Sin embargo me gustaría agradecer particularmente:

A mis padres Mónica y Nelson, a mi tía María José y mis hermanos Victoria, Rosina y Agustín por su apoyo y amor incondicional.

A las chicas del Área de Inmunohistoquímica del Hospital de Clínicas, Noelia y Ana, por la paciencia ampliamente desarrollada durante mis idas al segundo piso.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por la posibilidad de contar con una beca durante parte del desarrollo de la maestría (POS_NAC_2018_1_151919).

A todos los investigadores del IIBCE a los cuales acudí y se pusieron a disposición para colaborar con nuestro proyecto.

A los miembros del tribunal por aceptar evaluar esta tesis.

Y finalmente a mi tutora Silvia y cotutores Carmen y Dardo, por haber apostado y dedicado algo que no es retornable: su tiempo. Espero el producto final logre retribuir parte de lo brindado.

RESUMEN

Los gliomas son tumores primitivos del SNC que derivan de la transformación de células neuroectodérmicas de estirpe glial. De acuerdo a la OMS, desde 2016, los gliomas deben ser diagnosticados estudiando conjuntamente las marcas moleculares distintivas y los criterios histológicos tradicionales (diagnóstico integrado). En esta tesis, optimizamos los protocolos para realizar el diagnóstico integrado de oligodendrogliomas humanos difusos (OD, grado II) y anaplásicos (OA, grado III) y analizamos la activación de la vía del factor de crecimiento transformante beta (TGF β) y su posible correlación con la proliferación celular. Los índices de inmunoreactividad para los receptores de TGF β RI y RII y para el efector de la vía (Smad4 nuclear) mostraron aumentos significativos en el componente tumoral de los OA respecto de los OD. El análisis pareado de TGF β RI, RII y Smad4 con el índice de proliferación Ki67 dentro del tumor permitió validar la hipótesis de trabajo que sustentaba la existencia de una correlación positiva entre la activación de la vía y el aumento de proliferación celular cuando se comparan oligodendrogliomas de agresividad creciente. Los resultados de esta tesis confirman la importancia del diagnóstico integrado y aportan nuevos datos que permiten postular que en oligodendrogliomas la modulación de la vía de TGF β podría ser una diana terapéutica valiosa impidiendo la progresión tumoral y controlando la proliferación celular. Se debe agrandar la población analizada para aumentar la validez estadística de los resultados y profundizar el estudio de la vía para validar la nueva hipótesis dada su importancia terapéutica potencial.

PALABRAS CLAVE

Oligodendrogliomas, IDH1, FISH 1p 19q, TGF β RI, TGF β RII, Smad4, proliferación celular

ABSTRACT

Gliomas are CNS primitive tumors that derive from transformed neuroectodermal cells of glial lineage. According to WHO rules, since 2016, gliomas must be diagnosed by studying distinctive biomarkers together with the traditional histological criteria (integrated diagnosis). In this thesis, we have optimized the protocols for the integrated diagnosis of human diffuse (OD, grade II) and anaplastic (OA, grade III) oligodendrogliomas, and then analyzed the activation of the transforming growth factor beta (TGF β) pathway and its potential correlation with cell proliferation. The immunoreactivity indices for RI and RII TGF β receptors and for the pathway effector (nuclear Smad4) showed significant increases in the tumor component of OA with respect to OD. The paired analysis of TGF β RI, RII and Smad4 with the Ki67 proliferation index within the tumor allowed us validating the working hypothesis that supported the existence of a positive correlation between the activation of TGF β pathway and cell proliferation in oligodendrogliomas of increasing aggressiveness. Results obtained in this thesis confirm the importance of integrated diagnosis and provide new data that allows postulating that in oligodendrogliomas the modulation of the TGF β pathway could be a valuable therapeutic target by impairing tumoral progression and controlling cell proliferation. A greater population should be analyzed to increase the statistical validity of the results and deepen into the study of the TGF β pathway to validate the new hypothesis given its potential therapeutic relevance.

KEY WORDS

Oligodendrogliomas, IDH1, FISH 1p 19q, TGF β RI, TGF β RII, Smad4, cellular proliferation

INDICE

INTRODUCCIÓN	7
Cáncer	7
Concepto	7
Carcinogénesis	8
Análisis y clasificación de los tumores	11
Tumores del sistema nervioso central (SNC)	12
Epidemiología de los tumores del SNC	13
OLIGODENDROGLIOMAS	15
Vía de señalización de TGFβ: generalidades	23
TGFβ y cáncer	24
TGFβ y proliferación celular	25
Expresión de TGFβ en tumores del SNC	25
Rol de TGFβ en la angiogénesis	25
Rol de TGFβ en la evasión inmune	26
Vía de TGFβ como BLANCO TERAPÉUTICO EMERGENTE EN EL tratamiento de gliomas	26
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	28
Hipótesis	28
Objetivo general	28
Objetivos específicos	28
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	29
MATERIALES Y MÉTODOS	30
Tejidos humanos	30
Reactivos e insumos varios	30
Metodología	31
APROBACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN	31
Revisión del archivo de Anatomía Patológica y selección de casos	31
Obtención de cortes para estudios de H&E, IF, IHQ y FISH	31

Tinción convencional con H&E	31
FISH para detección de la co-delección 1p/19q	32
Análisis e interpretación de imágenes de FISH	35
Inmunohistoquímica	36
Criterios interpretativos de los resultados	38
Criterio para LA reclasificación de los tumores en base a los criterios de la OMS 2016	43
RESULTADOS	45
EPIDEMIOLOGÍA DE TUMORES CEREBRALES, GLIOMAS Y OLIGODENDROGLIOMAS EN EL REGISTRO DEL HOSPITAL DE CLÍNICAS	45
Frecuencia de cánceres del SNC y su distribución según los tipos histológicos	45
Distribución de los tipos de tumores neuroepiteliales según histogénesis y grado histológico	45
Características de los casos seleccionados para análisis	47
Características histológicas de los oligodendrogliomas seleccionados	48
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS OLIGODENDROGLIOMAS ESTUDIADOS	49
Presencia confirmada de la codelección 1p/19q en todos los oligodendrogliomas analizados	49
Presencia de la mutación IDH1 R132H en todos los casos analizados	50
Expresión de ATRX evaluada en 8/8 casos analizados	50
Expresión de p53 no mutada en todos los casos analizados	51
Confirmación y reclasificación de los oligodendrogliomas estudiados	52
EVALUACIÓN DE LA VIA DE TGF β EN LOS CASOS ANALIZADOS	53
Puesta a punto de la técnica inmunohistoquímica para TGF β RI, RII y Smad4	53
Falla en la inmunodetección de Smad2 usando las clonas 1B10 y 1C12	53
Falla en la inmunodetección de Smad4 usando las clonas 1G11 y 1D12	55
Expresión del receptor TGF β RI en los oligodendrogliomas analizados	57
Expresión del receptor TGF β RII en los oligodendrogliomas analizados	59
Expresión de Smad4 en los oligodendrogliomas analizados	61
Análisis conjunto de la expresión de los componentes de la vía TGF β	63
Índice de proliferación celular evaluada mediante expresión de Ki67	65
Análisis de la correlación entre la vía de TGF β y la proliferación celular	67

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	69
Limitaciones del estudio y valor de los datos epidemiológicos obtenidos	69
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y RECLASIFICACIÓN DE LOS oligodendrogliomas estudiados.....	70
análisis de la vía DE $\text{tgf}\beta$ y su correlación con la proliferación celular	70
PERSPECTIVAS	74
Anexos	Error! Bookmark not defined.
BIBLIOGRAFÍA.....	75

INTRODUCCIÓN

CÁNCER

CONCEPTO

Una neoplasia se define como un *“tejido de crecimiento autónomo que ha escapado de los mecanismos regulatorios de la proliferación celular y que exhibe cierto grado de fidelidad a su precursor”*¹, pudiendo asentarse en su órgano nativo (neoplasia primaria) o en un órgano distante (neoplasia secundaria). Aquellas neoplasias cuyo comportamiento no comprometan la vida del paciente son denominadas neoplasias benignas, mientras que las que son potencialmente mortales se denominan neoplasias malignas o cáncer². El cáncer es una colección y espectro de enfermedades con diferentes manifestaciones y en su versión más simple y moderna, es entendida como una enfermedad producto de una expresión anómala de los genes^{3,4}.

Este concepto complementa la definición clásica de Wills que definió tumor como *“una masa de crecimiento anómala en el cual el crecimiento es excesivo y descoordinado con el de los tejidos normales, persistiendo luego de cesado el estímulo que evocó el cambio”*³, ya que refleja la perspectiva histogénica tradicional y las concepciones celular y molecular mucho más actuales.

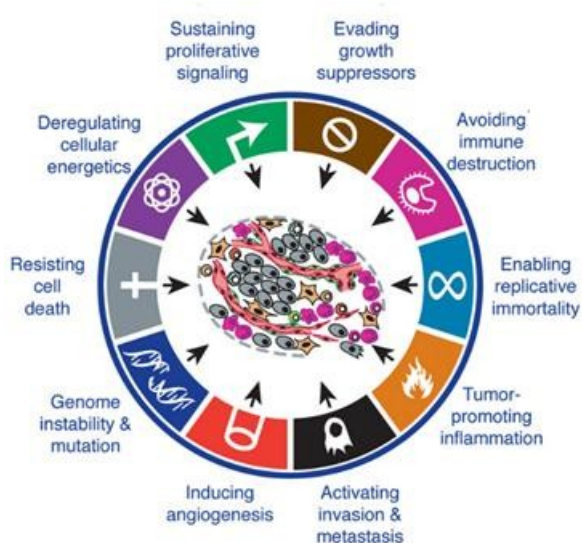


Figura 1 Características distintivas del cáncer y propiedades que favorecen el proceso tumorigénico. Tomado de Hanahan y Weinberg 2011⁵.

Hanahan y Weinberg⁶ (Figura 1), intentando organizar y sistematizar la complejidad de la biología del cáncer con una visión integradora, identificaron seis características distintivas (*“hallmarks”*) de esta patología: (1) autosuficiencia en las señales de crecimiento, (2) insensibilización frente a señales supresoras del crecimiento, (3) mecanismos evasores de la apoptosis, (4) potencial replicativo ilimitado, (5) inducción de la angiogénesis, (6) invasión y metástasis^{6,7}. Los mismos autores, diez años después, propusieron dos nuevas características distintivas emergentes: (1) disregulación de la energética celular con el fin de favorecer una neoplasia proliferante efectiva y (2) evasión del control inmunológico realizado por los linfocitos T, B, NK y macrófagos⁵ y dos propiedades que permiten o facilitan la adquisición de estas características emergentes: la inestabilidad genómica y

mutacional (propiedad que permite la progresión tumoral) y la capacidad del tumor de promover el microambiente pro-inflamatorio (Figura 1).

Este abordaje integrador al momento de intentar entender al cáncer implica un salto conceptual importante donde la visión centrada en la célula tumoral (*modelo reduccionista*) se traslada a todo el tumor, entendiéndolo como un tejido complejo donde las células mutantes cancerosas están rodeadas por células normales que colaboran activamente con la dinámica de las células tumorales (*“modelo heterotípico de la biología celular”*)⁶. Es así que a diferencia de los estudios iniciales que se focalizaban en el parénquima tumoral, los estudios actuales analizan el componente tumoral-neoplásico

propriadamente dicho, el componente de sostén (estroma)⁸ y el microambiente tumoral⁵, entendido como “el ambiente celular en el cual las células madre tumorales existen”⁹ (Figura 2). Este microambiente tumoral puede subdividirse topográficamente en microambiente tumoral primario/nuclear, microambiente tumoral invasor y eventualmente, de producirse, en microambiente tumoral metastásico⁵, cada uno con diferentes subpoblaciones celulares. En un plano de mayor complejidad, no solo se reconoce una heterogeneidad dentro de un tumor de un mismo paciente (*heterogeneidad intratumoral*) sino existen diferencias entre pacientes para un mismo subtipo tumoral (*heterogeneidad intertumoral*)¹⁰.

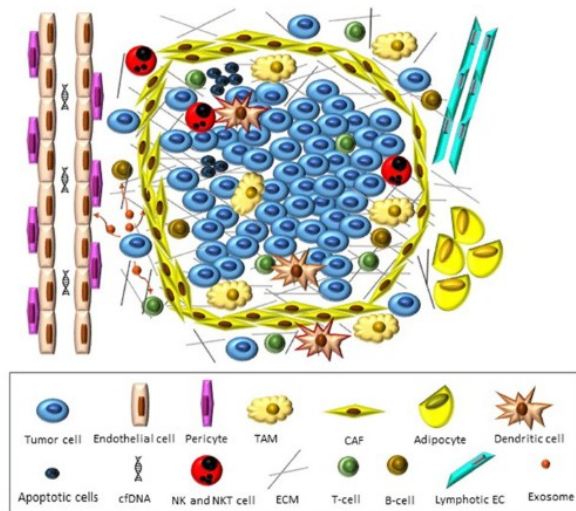


Figura 2 Esquema del microambiente tumoral con sus componentes celulares. Se representan las células tumorales en azul, enfatizando las múltiples células que componen el resto del tumor como los linfocitos, pericitos, células endoteliales, etc. Tomado de Baghban y cols.¹¹ Abreviaciones: ECM (matriz extracelular); CAF (fibroblastos asociados al cáncer); TAM (macrófago asociado al tumor); NK (Natural Killer); cfDNA (ADN circulante libre).

CARCINOGENÉISIS

Varios modelos intentan explicar la génesis del cáncer (*carcinogénesis*) y aportar al conocimiento de este proceso por el cual las células normales se vuelven malignas¹². Los cinco modelos más conocidos que se proponen explicar y describir la carcinogénesis son los siguientes: (1) mutacional, (2) de inestabilidad genómica, (3) no-genotóxico, (4) darwiniano y (5) organización tisular¹³. El modelo mutacional estuvo muy influenciado por el descubrimiento de la carcinogenicidad del tabaco y algunas exposiciones ocupacionales. Se basa fundamentalmente en la acumulación de mutaciones puntuales y la exposición a carcinógenos químicos. El modelo de inestabilidad genómica pone énfasis en la integridad del genoma y los genes relacionados con la reparación de errores. La idea básica es que los cambios en algunos genes que regulan la estabilidad cromosómica o la reparación del daño al ADN causan una cascada de eventos

que aumenta la frecuencia de mutaciones corriente abajo. El tercer modelo (no genotóxico) es más reciente, enfatiza los efectos no genotóxicos y sostiene que varios moduladores importantes del riesgo de cáncer (dieta, obesidad, hormonas y resistencia a la insulina) no actúan produciendo cambios en la estructura del ADN sino que producen cambios funcionales que incluyen eventos epigenéticos. El modelo darwiniano atribuye un papel importante a la expansión clonal (selección) de células y enfatiza el papel del ambiente en la selección de las células que tienen alguna ventaja adquirida. Un último modelo, más reciente, enfatiza el papel del microambiente que rodea a las células precancerosas y propone que lesiones proliferativas focales actúan como precursoras del desarrollo del cáncer, en un proceso celular no-autónomo que depende en gran medida de las señales derivadas del microambiente circundante. La arquitectura del tejido alterado resultante se traduce en la aparición de un microambiente tumoral único con vasos sanguíneos alterados y suministro sanguíneo aumentado que puede facilitar el desencadenamiento de cambios bioquímicos y metabólicos que alimentan la progresión del tumor. En este modelo, basado en el papel de los morfógenos durante la embriogénesis, se postula que las fallas en las condiciones que mantienen el equilibrio de la morfogénesis contribuyen a la carcinogénesis¹⁴.

Existe una superposición temporal y conceptual entre los modelos referidos previamente, los cuales conservan un poder explicativo y predictivo significativo, aun cuando no toman en cuenta mecanismos como la inflamación u otras variables importantes (reparación del ADN, influencia de la edad en la capacidad de reparación del ADN, rol de los microARN) que juegan un rol durante la carcinogénesis y están siendo incluidas en las distintas formulaciones de modelos matemáticos de carcinogénesis.

En este sentido, uno de los grandes aportes de los modelos citados previamente al estudio de la biología del cáncer ha sido la identificación de las distintas etapas secuenciales de la carcinogénesis: (1) iniciación, (2) promoción, (3) malignización y progresión tumoral^{8,14-16} (Figura 3).

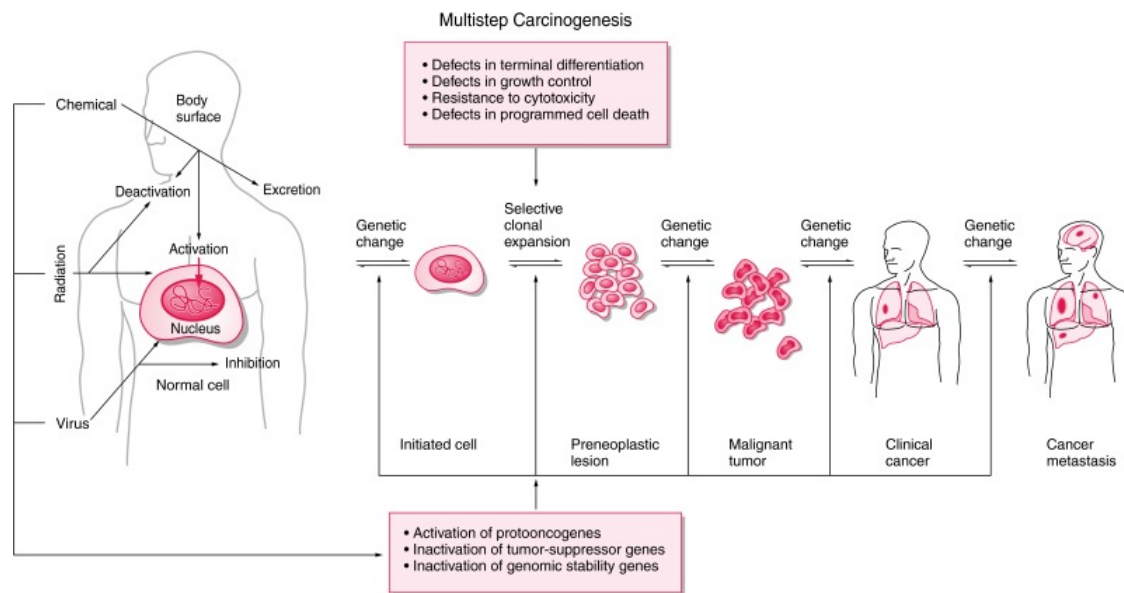


Figura 3 Esquema del modelo de carcinogénesis en etapas múltiples con los principales procesos observados en cada etapa. Tomado de Harris (2003)¹⁴.

La **iniciación** es el proceso por el cual ciertos agentes físicos, químicos o virales inducen un daño genómico irreversible en las células madre¹⁷ volviéndolas susceptibles al efecto de un agente promotor que permite la expansión del fenotipo transformado¹⁸. En el caso de la carcinogénesis química, los agentes carcinogénicos (asbesto, nitrosamina, níquel) promueven la formación de aductos con el ADN que interfieren con su replicación produciendo la activación de oncogenes o la inactivación de genes supresores tumorales¹⁴ que alteran el control del ciclo celular y favorecen la proliferación.

En la etapa de **promoción** se produce la expansión clonal de las células iniciadas generando una población dominante con eventos epigenéticos mediados por sustancias no mutagénicas que son capaces de reducir la latencia del tumor, aumentar el número de tumores capaces de ser formados¹⁴ o estimular directamente la proliferación celular.

La **malignización y progresión**, definidas como la transformación de las células pre-neoplásicas hacia un fenotipo maligno con capacidades invasoras a nivel local y potencialmente a distancia (metástasis) y la expansión de las células malignizadas con un grado de independencia e invasividad progresivamente mayores¹⁹, se identifican solo en los tumores malignos.

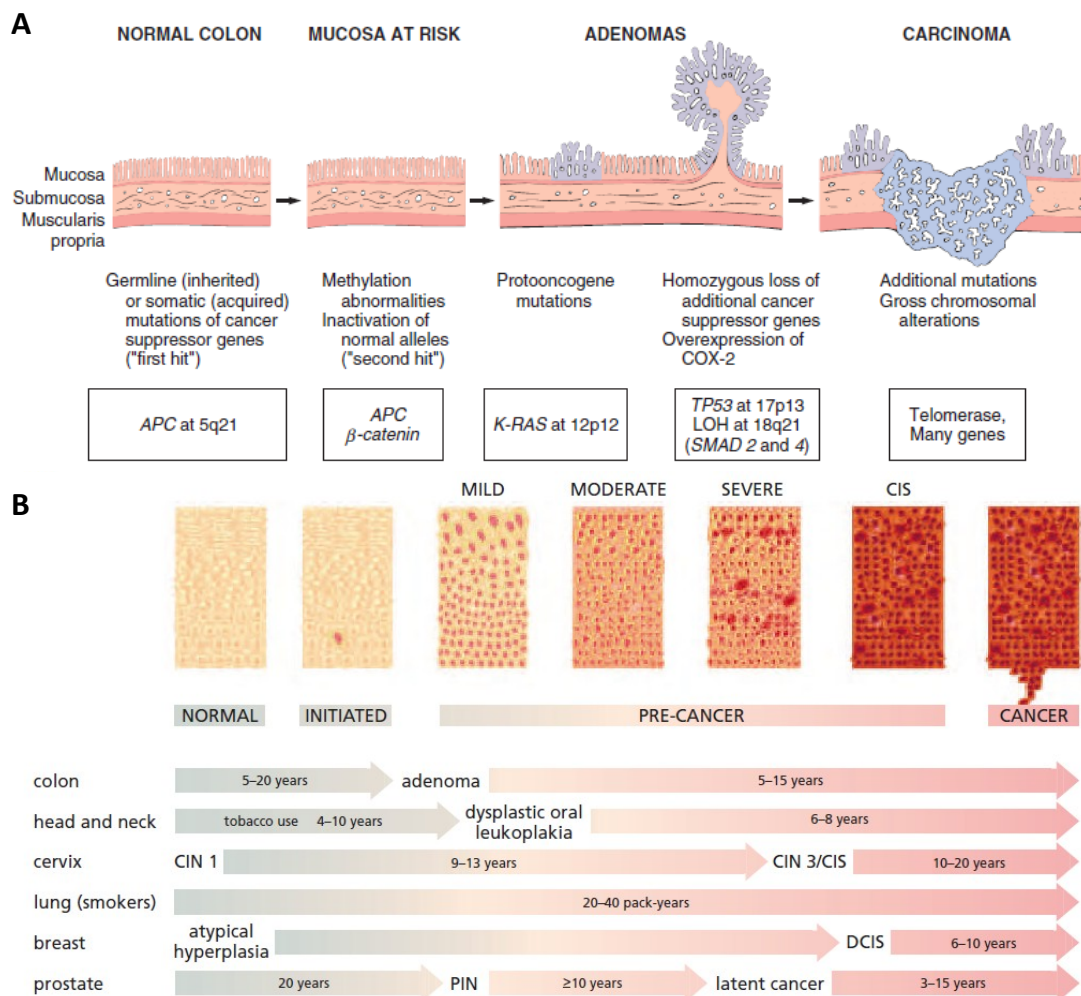


Figura 4 (A) Múltiples etapas de la carcinogénesis: el esquema muestra los cambios morfológicos secuenciales y las marcas moleculares asociadas. Tomado de Kurmar y cols. 2017⁸. (B) Curso temporal de las múltiples etapas de la carcinogénesis en función de la localización del cáncer. En la parte superior se encuentra un esquema de cambios citoarquitecturales inicialmente indetectables por morfología (iniciación) pero que posteriormente exhiben un subconjunto de etapas hasta llegar a un cáncer invasor. Tomado de Weinberg y cols. 2013¹⁹.

El análisis histológico de los tumores permitió por un lado, revelar que los tumores se encuentran formados por masas de células al igual que los tejidos normales y por el otro, documentar la existencia de un proceso en etapas múltiples cuyos cambios morfológicos están relacionados con el fenotipo maligno a nivel genético¹⁹. En el colon fue uno de los primeros sitios dónde se demostró las etapas secuenciales de la carcinogénesis, describiéndose lesiones precursoras (displasias) definidas por alteraciones citológicas e histológicas (Figura 4 B) y una noción de grados de displasia en base a la profundidad de los cambios citoarquitecturales²⁰. Estos hallazgos, junto con la información sobre el curso temporal de las distintas etapas para los diversos tipos o regiones afectadas (Figura 4 A), resultaron vitales para definir programas de seguimiento y valoración de riesgo de evolución a neoplasias malignas invasoras²¹. El avance de la biología molecular permitió identificar las alteraciones genéticas en las distintas etapas de la carcinogénesis⁸.

ANÁLISIS Y CLASIFICACIÓN DE LOS TUMORES

Desde una perspectiva anatomopatológica tradicional, las características histológicas relevantes al momento de estudiar y clasificar un tumor usualmente incluyen la estirpe tumoral, el tamaño tumoral, la integridad del tejido, la morfología celular (*atipia*), el grado histológico, la expresión aberrante de proteínas, la evidencia de transformación maligna, la evidencia de senescencia y proliferación, las características del componente invasor tanto en su forma (expansivo ó infiltrante) y profundidad, así como la extensión de la vascularización entre otras²².

La estirpe tumoral está definida a semejanza del aspecto histológico y perfil inmunohistoquímico del tumor con respecto a los tejidos sanos: epitelial, mesenquimática, neuroectodérmica (incluye neuroepitelial y melánico), linfoide y germinal²³ y sus contrapartidas malignas respectivas: carcinomas, sarcomas, gliomas, melanomas, linfomas y tumores germinales⁸.

En base al grado de similitud con su contrapartida normal o benigna, las neoplasias se subdividen a su vez en: bien diferenciadas, pobremente diferenciadas o indiferenciadas cuando no se identifican elementos morfológicos ni inmunofenotípicos identificatorios²⁴.

Las células neoplásicas usualmente muestran alteraciones morfológicas (*atipia celular*) manifestada por cambios nucleares y citoplasmáticos. A nivel nuclear, se describe aumento de la relación núcleo: citoplasma, nucleomegalia, alteraciones del patrón cromatínico (hipercromasia, marginalización de la cromatina perinuclear), presencia de nucléolo prominente y en ocasiones múltiples nucléolos²⁴. A nivel extranuclear se describen alteraciones en los productos de secreción (presencia o ausencia de mucina) o en las estructuras de especialización apical (cilias, microvellosidades)²⁴.

En base a su comportamiento biológico, las neoplasias se dividen en malignas o benignas⁸, lo que denota la agresividad y la causalidad de fallecimiento¹. Los tumores benignos suelen ser lesiones bien circunscriptas factibles de resección quirúrgica y por ende de curación. Los tumores malignos en cambio, tienden a ser infiltrantes, a producir metástasis y su resección puede ser limitada o imposible⁸. Existen entidades que no responden a esta división dicotómica y han dado origen a términos como “*neoplasia de potencial maligno incierto*”, “*borderline*”²⁵, “*neoplasia de bajo potencial maligno*”²⁶ o simplemente “*neoplasia*”, cuyo comportamiento recaerá en un diagnóstico retrospectivo^{27,28}.

El criterio morfológico imperante hasta hace muy poco tiempo ha permitido la clasificación de los distintos tipos tumorales y ha sido imprescindible para el desarrollo del saber médico, la realización de diagnósticos y el diseño y asignación de tratamientos específicos²⁹. El avance del conocimiento de la biología del cáncer y de las herramientas metodológicas y tecnológicas ha llevado a la incorporación paulatina de criterios moleculares, genéticos y bioquímicos en la clasificación de los mismos, lo que conlleva a una evolución continua de dicha clasificación.

En efecto, debido al aumento de la evidencia, a la fecha, el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos reconoce aproximadamente 200 tipos y aproximadamente 800 subtipos de cánceres²⁹. Por su parte, los manuales conjuntos de la OMS y de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC del inglés *International Agency for Research on Cancer*) son fundamentales para la medicina porque permiten un lenguaje común a nivel mundial basado en la mejor evidencia y la actualización continua.

TUMORES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC)

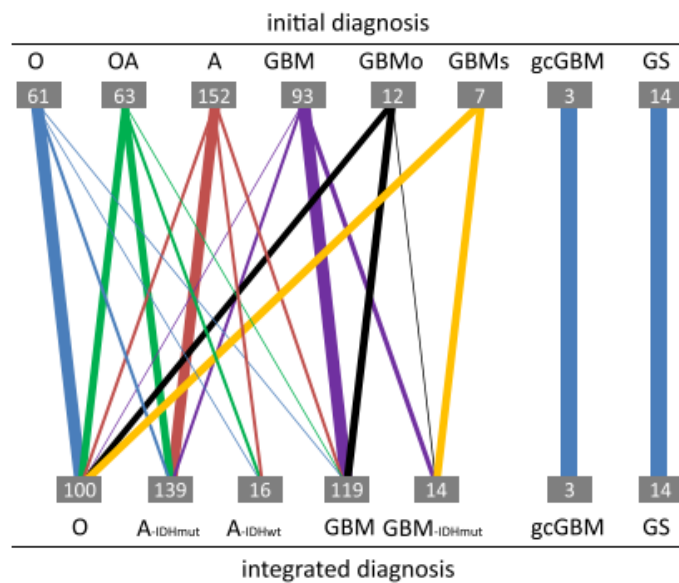


Figura 5 Reclasificación de los gliomas aplicando el diagnóstico integrado. Región superior de la imagen, corresponden los diagnósticos morfológicos. Región inferior de la imagen, corresponde a los diagnósticos integrados de la clasificación 2016 de la OMS. Si bien ocurren cambios de categorías, globalmente los hallazgos morfológicos se correlacionan con firmas moleculares. Se destaca que luego de aplicados parámetros moleculares la categoría Oligoastrocitomas (OA) desaparece. Tomado de Schweizer et al 2014³⁰. Abreviaciones: O (Oligodendroglioma); OA (Oligoastrocitoma); A (Astrocitoma); GBM (Glioblastoma multiforme); GBMo (Glioblastoma multiforme con componente oligodendroglial); GBMs (Glioblastoma de células posteriores publicadas en 1993, 2000, 2007 y 2016²⁸. La clasificación del 2016, basada fundamentalmente en el Consenso de Haarlem de la Sociedad Internacional de Neuropatología de 2014³², representó un cambio en el paradigma en la definición de los tumores del SNC, porque por primera vez incluyó a parámetros de biología molecular como características definitorias de los tumores, y en algunas circunstancias, independientemente de la morfología histológica convencional³³. Este tránsito en la neuropatología desde lo histológico tradicional a lo molecular produjo una reestructuración en diversos tipos de tumores del SNC. En gliomas en particular, se consagró la distinción entre dos grandes categorías: los que presentan la enzima isocitrato deshidrogenasa (IDH) mutada y los que no la presentan³⁴ (Figura 9, pág. 17). Si bien no se pueden distinguir a nivel histológico, claramente son grupos diferentes con perfil etarios y pronósticos distintos³⁵.

Existe una necesidad de reevaluación de muchas entidades de la “era” pre-IDH aplicando los criterios establecidos en 2016²⁸ ya que la evidencia muestra que muchos de los tumores clasificados con criterios histológicos no contaban con la firma molecular correspondiente y el diagnóstico integrado llevó a reclasificar a varios de ellos (Figura 5). Sin embargo, la clasificación 2016 presenta dificultades que incluyen la presencia de información molecular contradictoria, la complejidad al momento de integrar todos los parámetros y la imposibilidad de cubrir todas las particularidades que presenta el cáncer³⁶. Por lo tanto, varias de las conclusiones referidas a marcadores diagnósticos y pronósticos están sujetos a actualización permanente³⁷.

Los tumores del SNC son un tipo de neoplasias con muchos subgrupos morfológicos y diferentes patrones comportamentales³¹. Un tumor del SNC es producido por el crecimiento descontrolado de células derivadas de componentes cerebrales (tumores primarios) o de células tumorales localizadas en otras áreas del organismo (metástasis). Su clasificación, al igual que en el resto de la economía del cuerpo, cuenta con una rica historia que comienza con una publicación a inicios del siglo XX que sentó el primer mojón en la sistematización de estas neoplasias. Esta publicación junto con el aporte de neuropatólogos a nivel mundial generó la primera edición de la clasificación de los tumores del SNC (del inglés “*Histological Typing of Tumours of the Central Nervous System*”) editado por la OMS en 1979. Los avances científicos fueron reflejados en las ediciones

EPIDEMIOLOGÍA DE LOS TUMORES DEL SNC

El cáncer representa uno de los problemas de salud más urgentes a nivel mundial. En 2018 fue la segunda causa de muerte a nivel global con más de 9 millones y medio de muertes, 70% de ellas ocurridas en países de recursos bajos y medianos³⁹ (Figura 6 A). En Uruguay se diagnostican aproximadamente 15000 casos nuevos (excluido melanoma cutáneo) y hay más de 8000 muertes anuales producidas por cáncer⁴⁰, lo que representa casi el 25% del total de defunciones registradas en el país cada año, ubicándose pocos dígitos por debajo de las enfermedades del aparato circulatorio que constituyen la primera causa de muerte nacional⁴¹.

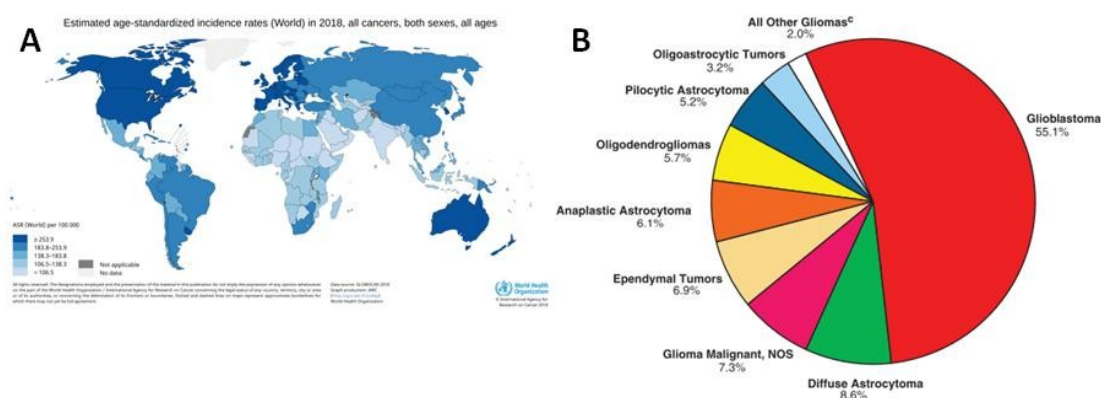


Figura 6 (A) Tasa de incidencia de cáncer a nivel mundial. Se observa que Uruguay presenta un perfil similar al de países desarrollados en comparación con otros de los países de la región. Tomado y adaptado de <https://gco.iarc.fr>. (B) Frecuencia de gliomas en adultos en EEUU para el período 2012-2016 destacando que la amplia mayoría corresponden a gliomas de alto grado. Los oligodendrogliomas son aproximadamente el 6% y los oligoastrocitomas el 3%. Tomado y adaptado de Ostrom y cols. 2016³⁸.

Los tumores del SNC son aproximadamente el 3% de todos los cánceres en el mundo, con una variabilidad muy grande entre las distintas regiones, con las mayores tasas en Europa, las menores en Asia y una incidencia mayor en los países más desarrollados³¹. Estos tumores afectan a niños y adultos y han sido diagnosticados en todas las regiones anatómicas del SNC, con el 90% en el cerebro y el restante 10% en las meninges, la médula espinal y los nervios craneales. Representan una fuente significativa de morbilidad y mortalidad desproporcionada con su incidencia debido a las altas tasas de mortalidad, efectos incapacitantes (pérdida de visión, distorsiones en el habla, cefaleas, convulsiones, parálisis) y discapacidad⁴².

Aproximadamente la tercera parte de todos los tumores cerebrales son gliomas y en Estados Unidos representan el 2% del total de tumores del adulto, en su mayoría son agresivos y de mala evolución⁴³. En Uruguay, para el período 2012-2016, se registraron 615 casos nuevos en hombres y 534 en mujeres, posicionándose como la novena causa de muerte (2.53%) dentro del total de cánceres⁴¹ en las mujeres. El 80% de los gliomas son malignos⁴².

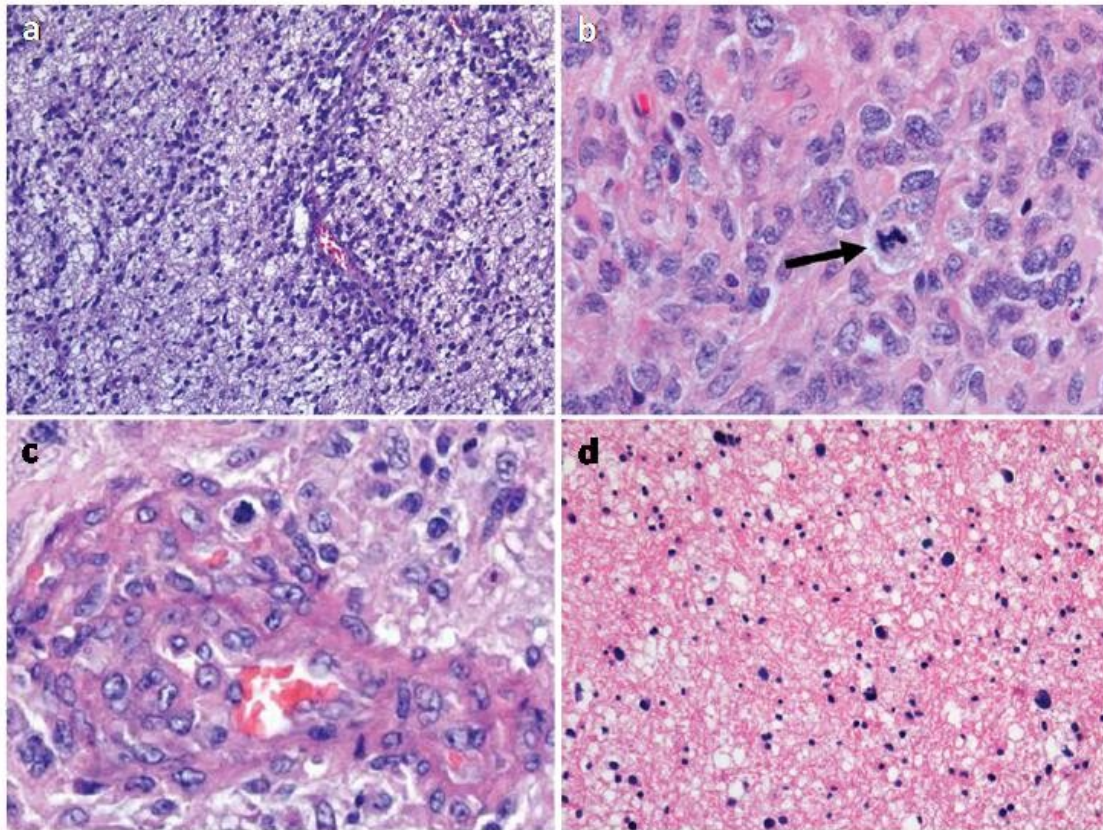


Figura 7 Ejemplos de los conceptos utilizados para la asignación del grado histológico. (a) Celularidad: la densidad celular puede variar de discreta a marcada dentro de un mismo tumor lo que usualmente está asociado al grado; (b) Mitosis: la presencia de figuras mitóticas (flecha) apunta a grados histológicos mayores; (c) Hiperplasia microvascular: hace referencia a la presencia de vasos sanguíneos donde se identifica más de una capa de células endoteliales; (d) Atipia: se observan múltiples células neoplásicas donde es común la diversidad de tamaños y formas nucleares. Tomado de Kros y cols. 2011⁴⁴.

Los gliomas son tumores primitivos del SNC originados a partir de las células gliales⁴⁵, clasificándose en: (a) **astrocitomas**: tumores desarrollados a partir de los astrocitos. Son los tumores cerebrales primarios intraaxiales más comunes y representan casi la mitad de todos los tumores cerebrales primarios. El grado más alto (glioblastoma) es el tumor cerebral de mayor malignidad; (b) **gliomas del tronco encefálico**: tumores poco frecuentes que se encuentran en el tronco encefálico y que en general no pueden ser extirpados quirúrgicamente debido a su ubicación incompatible con tratamiento quirúrgico amplia; (c) **ependimomas**: tumores desarrollados a partir de las células ependimarias que recubren los ventrículos o el epéndimo de la médula espinal. Son raros en adultos y representan del 2 al 3% de los tumores cerebrales primarios más frecuentes en los niños; (d) **gliomas mixtos** (oligoastrocitomas) están formados por más de un tipo de células gliales. Su diagnóstico como un tipo de tumor distinto es controvertido y puede resolverse con el cribado genético del tejido tumoral; (e) **oligodendrogliomas**: formados a partir de oligodendrocitos, las células responsables de la síntesis de mielina en el SNC⁴⁶.

De acuerdo con la OMS, los gliomas también son clasificados en grados que reflejan el nivel de anormalidad de las células y la agresividad del tumor. Estos grados varían del menor (I) al mayor (IV) según los criterios de atipia celular, mitosis y proliferación microvascular y/o necrosis (Figura 7)²⁸. Los tumores que carecen de esas características son de grado I y los que presentan algunas de ellas corresponden al menos a un grado II. Los tumores de grado I suelen ser considerados tumores benignos. Los gliomas difusos grado II, III y IV son malignos, siendo el glioblastoma el grado máximo en gliomas. La

gradación de la OMS también es imprescindible al momento de indicar el pronóstico del paciente frente al tumor en cuestión^{28,44}.

OLIGODENDROGLIOMAS

CONCEPTO

Los oligodendrogliomas se definen como un glioma de bajo grado infiltrante compuesto por células neoplásicas que morfológicamente recuerdan a la oligodendroglia⁴⁶. Si bien esta definición era suficiente en el 2007, a la fecha se requiere además la presencia de mutación en los genes IDH-1 o IDH-2 en conjunto con la combinación de delección del brazo corto del cromosoma 1 (1p) y largo del cromosoma 19 (19q)²⁸. Los oligodendrogliomas representan un 2% del total de tumores primarios del sistema nervioso central y aproximadamente un 6% de todos los gliomas^{46,47}. Se desarrollan a cualquier edad pero el pico de incidencia es en el adulto entre la cuarta y quinta década de vida, siendo raros en niños, con discreto predominio en hombres frente a mujeres^{28,35}. En Uruguay no contamos con datos nacionales estratificados ni discriminando los diferentes subtipos tumorales. Clínicamente, la presentación como un episodio convulsivo es común en estos gliomas, así como cefaleas, disartria, trastornos de conducta y síndromes focales neurológicos⁴⁸. Los oligodendrogliomas suelen tener un mejor pronóstico que la mayoría de los otros gliomas difusos²⁸.

CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS, INMUNOHISTOQUÍMICAS Y GRADO HISTOLÓGICOS

Los oligodendrogliomas son tumores de crecimiento difuso, de celularidad variable, compuesta por células medianas y uniformes, de núcleo redondeado a ovoideo con un clásico halo perinuclear claro en el material fijado en formol e incluido en parafina⁴⁶. El tamaño nuclear en los oligodendrogliomas usualmente es mayor al de los núcleos de un oligodendrocito normal, con un patrón de cromatina menos compacto y con un pequeño nucléolo evidente en los especímenes bien conservados⁴⁶. Usualmente se dispone en un patrón de sábanas sólidas o en nódulos, en un fondo de una red capilar ramificada denominada en “alambre de gallinero” o “endocrinoide”^{49,50}. En algunas circunstancias los oligodendrogliomas pueden mostrar una morfología similar a astrocitomas que son denominados como “oligodendrocitos gliofibrilares”, “minigemistocitos” o “microgemistocitos”^{46,51} (Figura 8).

El patrón de crecimiento infiltrante en oligodendrogliomas es similar al observado en los otros gliomas difusos, aunque la formación de estructuras secundarias de Scherer (satelitosis perineuronal, agregados perivasculares y extensión leptomeníngea) tiende a ser más pronunciadas⁴⁶. Las calcificaciones son típicas en estos tumores aunque no exclusivas²⁸.

Los oligodendrogliomas se clasifican como difusos (OD) que corresponden a un grado II o anaplásicos (OA) que corresponden a un grado III²⁸. Los primeros son de crecimiento más lento y de menor agresividad que los segundos²⁸.

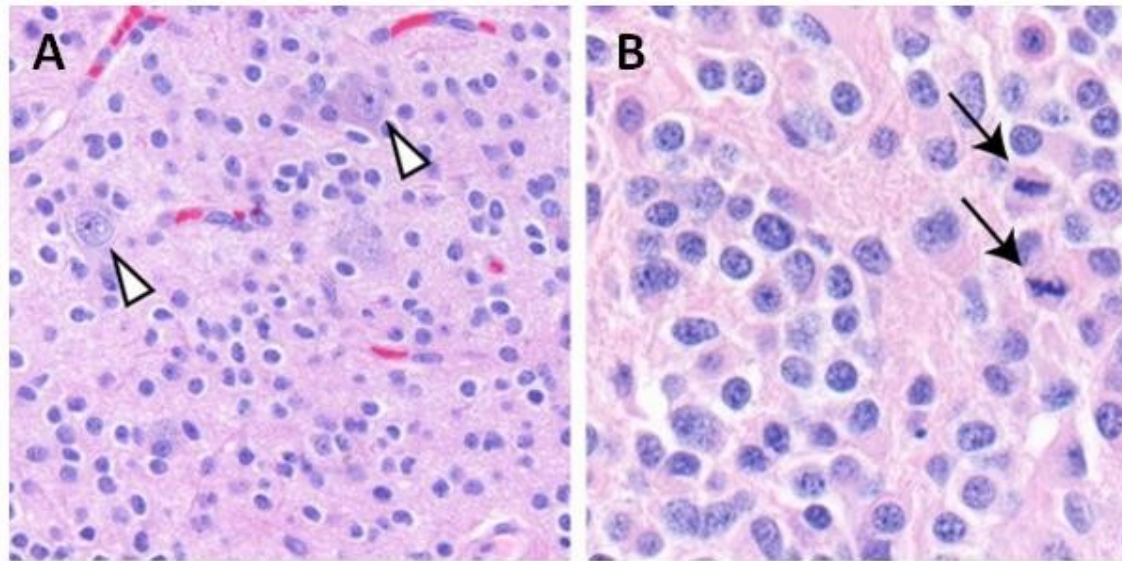


Figura 8 Características histológicas de un oligodendroglioma. (A) Se observa el carácter infiltrante evidenciado por oligodendrocitos malignos dispuestos en la periferia de las neuronas (satelitosis) acompañado de un componente vascular delicado. (B) Mayor magnificación, se observan las células con el halo claro perinuclear (“en huevo frito”) distintivas de los oligodendrogliomas. Las flechas indican dos figuras mitóticas. Imágenes tomadas y adaptadas de Wood y cols. 2019⁵².

GLIOMAGÉNESIS

El proceso de transformación de una célula glial en tumoral no es totalmente conocido y se proponen diversos modelos y vías para explicarla. Todos ellos implican un conjunto de mutaciones que sugieren la pérdida del fenotipo glial normal hacia un fenotipo tumoral. Se han identificado diversos factores de riesgo que influyen sobre la génesis de los gliomas (exposición a toxinas, radiación, infecciones virales, enfermedades genéticas y cambios cromosómicos) así como varios genes (TP53, PTEN, CDKN2A y EGFR) que están mutados, y múltiples mecanismos genéticos que facilitan la resistencia terapéutica de las células tumorales⁵³. Por ejemplo, se ha observado que la mutación de TP53 ocurre en el astrocitoma, mientras que la amplificación de EGFR y la mutación de PTEN son características distintivas de algunos subtipos de gliomas de alto grado⁵⁴. Estos gliomas tienen una alta carga mutacional y sus firmas genómicas son complejas (alteraciones significativas del número de copias, variantes de un solo nucleótido y variantes estructurales) y presentan factores predisponentes heredados que incluyen mutaciones de la línea germinal en los genes supresores de tumores TP53 y neurofibromina 1 (NF1), mutaciones en los genes codificantes para PDGFRA o EGFR y/o amplificación focal de CDK4, CDK6 y ciclina D1⁵³.

A su vez, la mutación en el gen codificante para IDH1 o 2 y posteriormente la codeleción 1p/19q, mutaciones en el TERT, mutaciones en CIC y FUBP1 entre otras alteraciones genéticas⁵⁵, conllevan a la génesis de los oligodendrogliomas (Figura 9).

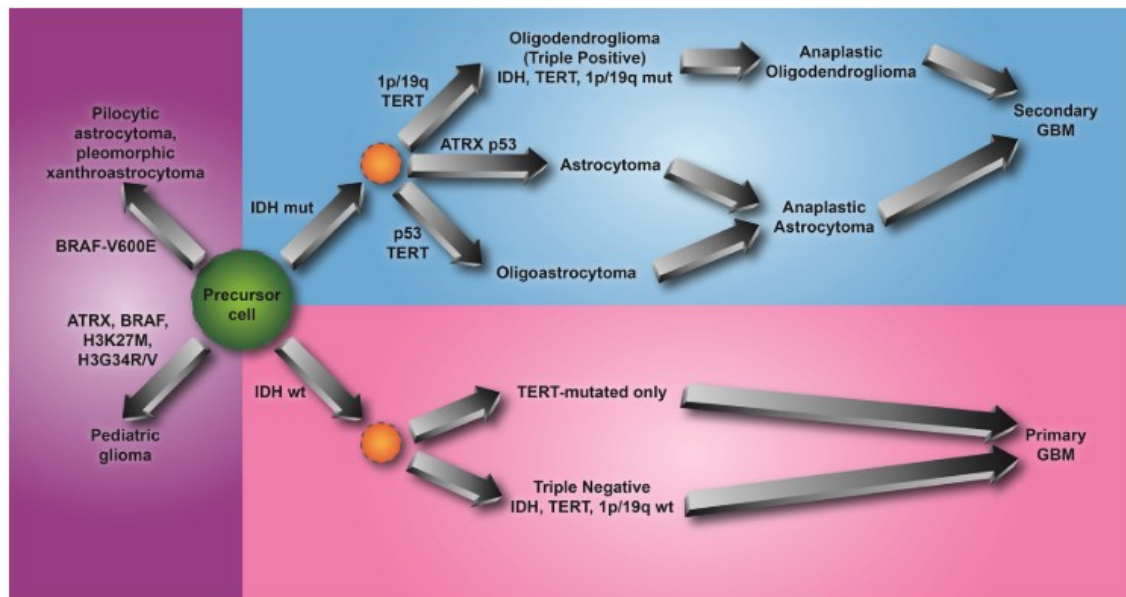


Figura 9 Esquema de la gliomagenesis para tumores de estirpe astrocitaria y oligodendroglial. Las células precursoras pueden dar origen a tumores gliales circunscritos (en color violeta superior) o a formas gliales con IDH mutada que originan gliomas agresivos (rosado, “GBM primarios”) o un tercer grupo, de comportamiento menos agresivo que de linaje astrocitario u oligodendroglial (celeste). Las abreviaciones indican las mutaciones identificatorias de cada subtipo. Abreviaciones: H3K27M (mutación en Histona 3 con cambio de aminoácido lisina por metionina en la posición 27); H3G34R/V (mutación en la Histona 3 con cambio de aminoácido glicina por arginina o valina en la posición 34); BRAF V600E (mutación en gen BRAF con cambio de valina por ácido glutámico); wt (salvaje, no mutado). Tomado de Karsy y cols. 2017⁵³.

BIOMARCADORES DE OLIGODENDROGLIOMAS

La definición más simple de biomarcador hace referencia a una característica medible y utilizada como indicador de un proceso biológico normal, patológico o a una respuesta frente a una intervención⁵⁶. En neuropatología, los biomarcadores pueden ser clasificados en⁵⁷:

- (a) Diagnósticos: aquellos que permiten la clasificación de las enfermedades⁵⁸;
- (b) Pronósticos: son los que demuestran una asociación con una variable específica como la supervivencia global o supervivencia libre de enfermedad independientemente del tratamiento recibido o en su ausencia⁵⁹;
- (c) Predictivos: aquellos que seleccionan grupos que probablemente respondan a una terapia específica. Un ejemplo sería la evaluación de una mutación específica y la respuesta a inhibidores farmacológicos específicos⁶⁰.

Tal como se esquematiza en la Figura 9, entre los principales biomarcadores en gliomas difusos se destacan las mutaciones en los genes IDH1/IDH2, la codeleción 1p/19q, la mutación H3K27M, mutaciones en el promotor TERT, la metilación del promotor MGMT, la amplificación del gen EGFR y la pérdida de la heterocigosidad de gen codificante para CDKN2A/B^{28,61–63}.

MUTACIONES PUNTUALES EN IDH1/2

El descubrimiento de las mutaciones en los genes IDH1 e IDH2 fue el inicio del diagnóstico molecular en la neuropatología⁶⁴. Se considera que estas mutaciones son unas de las más tempranas en el proceso de transformación celular y parecen funcionar como *driver* prevalentes en los gliomas difusos de bajo grado⁵⁵. Son mutaciones puntuales sin sentido (*missense*) y son heterocigóticas, produciéndose en el

gen IDH1 más frecuentemente que en el IDH2. En IDH1, el 92.7% de los casos presenta una mutación puntual que produce el cambio de una guanina por adenina (G395A) causando la sustitución de una arginina por una histidina (R132H) lo que modifica la actividad de la enzima IDH1 codificada⁶⁵⁻⁶⁷. Raramente se detectan otras mutaciones en IDH1^{67,68}. Las mutaciones en el gen IDH2 son extremadamente raras, siendo R172G, R172M y R172K²⁸ las más comunes (Figura 10 la, lb).

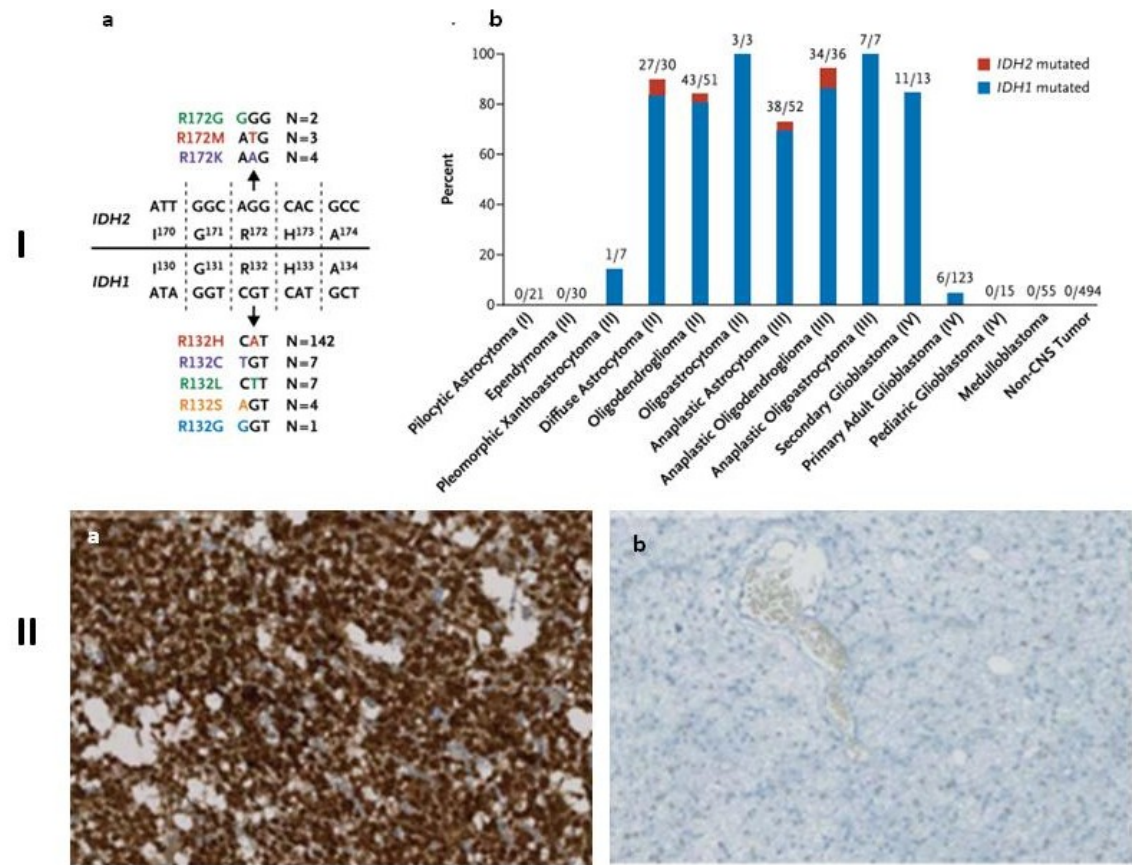


Figura 10 (I) Principales mutaciones en IDH1 e IDH2 y su frecuencia en los distintos tipos de gliomas humanos. En (a) se observan las diferentes mutaciones puntuales de tipo missense destacando que la gran mayoría devienen en la proteína mutada R132H. (b) Del total de gliomas evaluados, las mutaciones en IDH1 son francamente más frecuentes que en IDH2. Tomado y adaptado de Yan y cols. 2009⁶⁶. (II) Técnica de inmunohistoquímica para la detección de pIDH1 R132H. (a) Caso mutado donde se observa marcación citoplasmática (con difusión nuclear), intensa, difusa en la proliferación. (b) Caso de glioma sin la mutación, donde únicamente se observa la contratinción con hematoxilina. Tomado y adaptado de Sahm y cols. 2014⁶⁹.

Las enzimas IDH1, de localización citosólica, e IDH2, de localización mitocondrial, participan en el ciclo del ácido tricarboxílico catalizando la conversión del isocitrato a α -cetoglutarato. Las formas mutadas modifican su actividad enzimática catalizando la transformación del α -cetoglutarato en 2-hidroxiglutarato (2HG). Este último participa en vías metabólicas que favorecen la proliferación celular, alteran el patrón de metilación íntimamente relacionado con la tumorigénesis y aumentan el estrés oxidativo que es considerado un inductor directo de la tumorigénesis (Figura 11)⁷⁰.

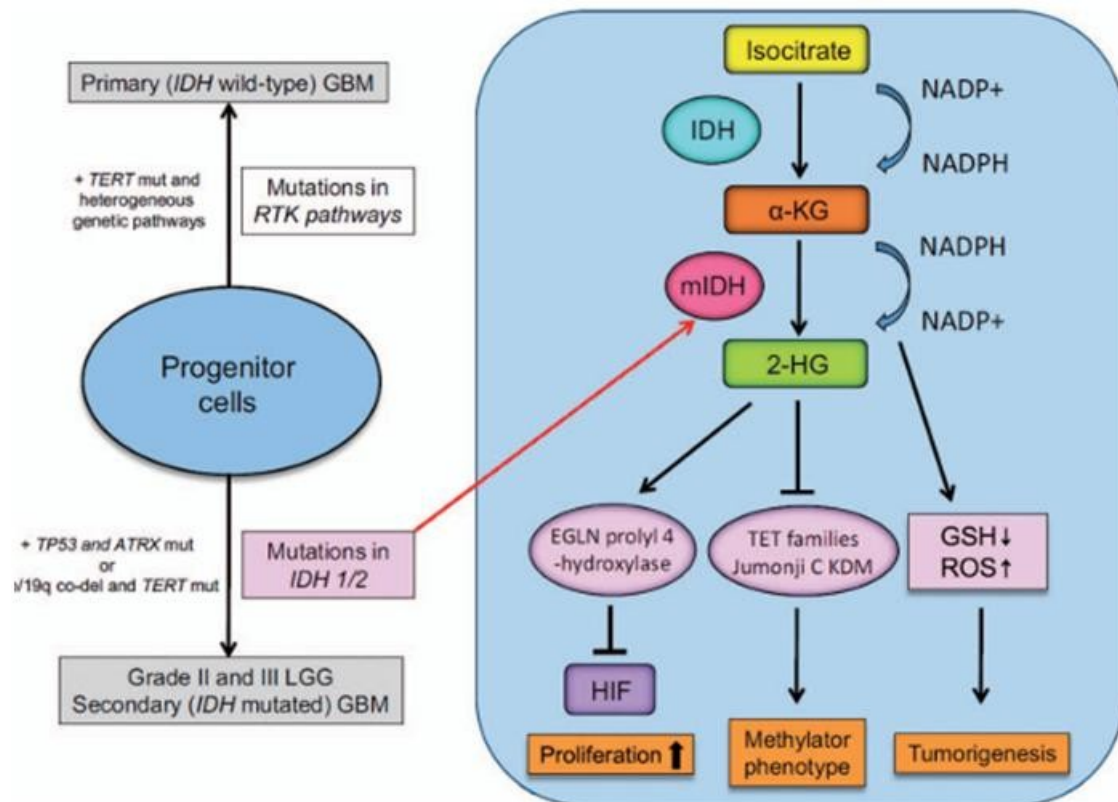


Figura 11 Papel de IDH normal o mutada en el proceso de gliomagénesis. A la izquierda se muestra como una célula progenitora puede sufrir mutaciones que inducen su transformación en tumoral e indica como las mutaciones en IDH1/2 participan en la formación de los gliomas de grado II y III y en los glioblastomas secundarios. A la derecha se esquematizan el sustrato de IDH1/2 y las cascadas que modula. Tomado de Sunhee 2018⁵⁵.

MUTACIONES EN ATRX Y p53

La proteína del síndrome de alfa-talasemia y retraso mental ligado al cromosoma X, ATRX (del inglés *alpha-thalassaemia/mental retardation syndrome X-linked*), pertenece a la familia de helicasas de ADN que juegan un rol fundamental en la modulación de la cromatina y en el mantenimiento de los telómeros⁵³. Se encuentra mutada con extremada frecuencia en astrocitomas GII, astrocitomas GIII, glioblastoma secundario pero raramente en los glioblastomas primarios y en tumores oligodendrogiales⁷¹. La mutación de ATRX conlleva la pérdida de expresión de la proteína y constituye un elemento diagnóstico en la distinción entre astrocitomas y oligodendrogliomas^{28,72} por lo que la inmunohistoquímica es una herramienta valiosa para su identificación (Figura 12, (a) y (b), pág. 20).

La proteína p53 juega un rol fundamental en el control del ciclo celular (detención en G1, reparación del ADN, apoptosis y mecanismos de diferenciación)⁷⁴ y su pérdida de función causada por mutaciones promueve el cáncer en humanos y en modelos animales⁷⁵. El gen codificante para p53 es uno de los más frecuentemente mutados en cáncer. Está alterado en gliomas de fenotipo astrocitario (astrocitomas difusos GII, anaplásicos GIII y glioblastoma secundario) pero es raro que ocurran mutaciones en oligodendrogliomas y ependimomas²⁸. La presencia de mutaciones en p53 puede analizarse por PCR o inmunohistoquímica (82, 84) (Figura 12, (c) y (d)).

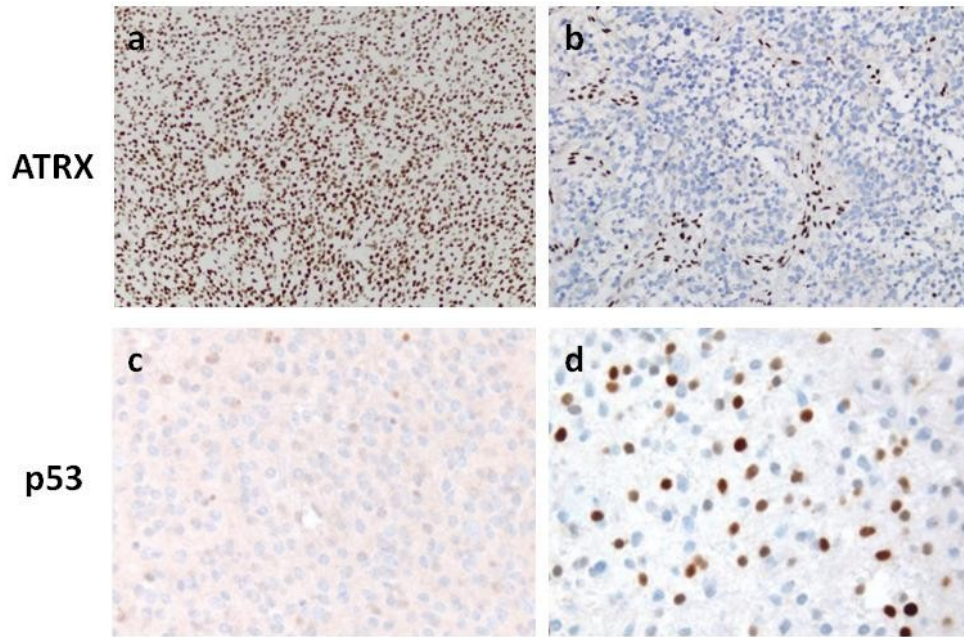


Figura 12 Estudio por inmunohistoquímica para ATRX y p53. (a) Patrón no mutado para ATRX, evidenciado por marcación positiva, intensa, difusa y nuclear para el componente tumoral. (b) Patrón mutado de ATRX evidenciado por ausencia de expresión nuclear para la proteína, con control interno positivo en células endoteliales. (c) Patrón no mutado de p53 dado por marcación débil a moderada, heterogénea en las células tumorales. (d) Patrón mutado para p53 evidenciado por positividad intensa y mayor al 60% en la población neoplásica. Tomado y adaptado de Pekmezci y cols. 2015⁷³.

CODELECCIÓN 1p/19q

En la mayoría de los tumores es frecuente observar una variedad de anomalías cromosómicas caracterizadas por cambios a nivel estructural o numérico. Dada su relevancia, algunas de estas anomalías son incluidas como elementos diagnósticos, pronósticos y predictivos⁷⁶.

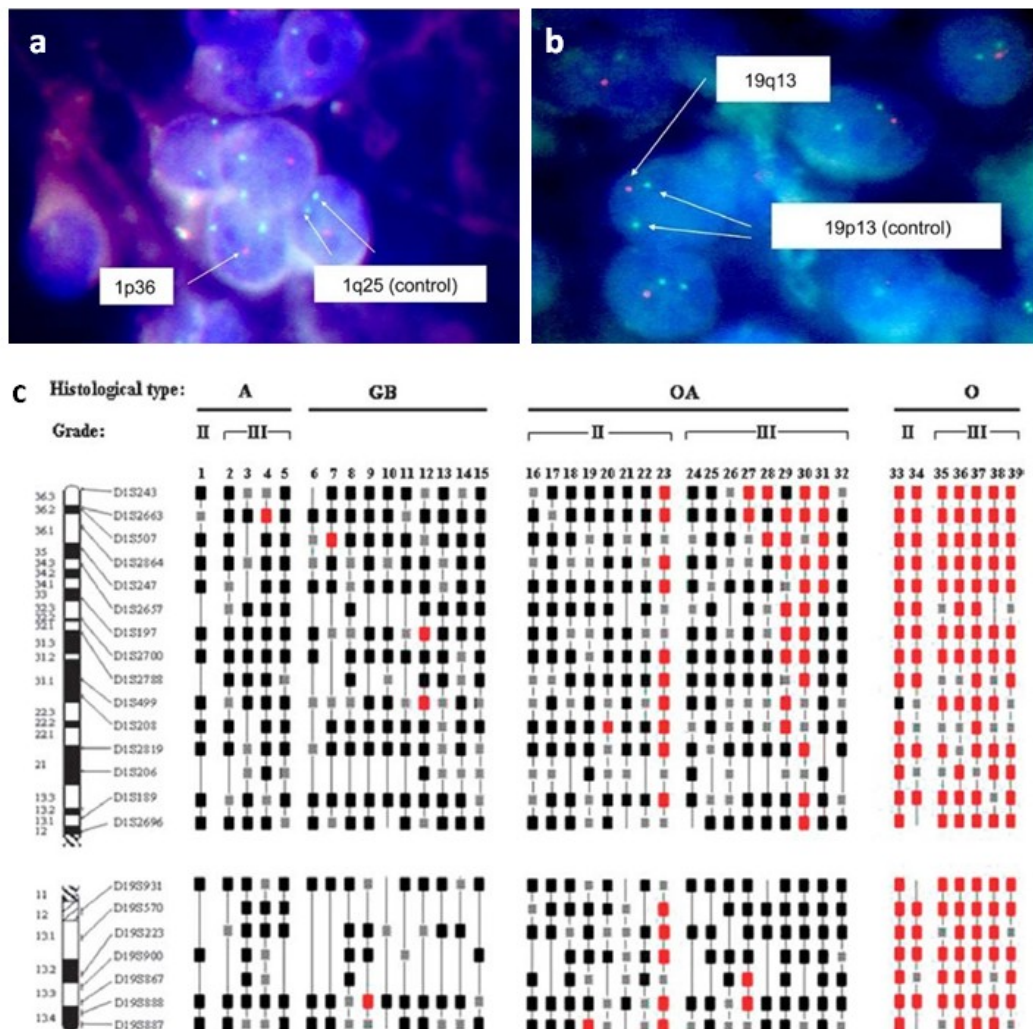


Figura 13 Métodos de estudio para la codelección 1p/19q. (a) y (b) Estudio mediante FISH en donde se observan deleciones completas evidenciadas por el patrón de dos señales verdes (controles centroméricos) y una señal roja correspondiente a la sonda dirigida para el 1p o 19q respectivamente (flechas). (c) Estudio de SNP para 1p y 19q en astrocitomas, glioblastomas, oligoastrocitomas y oligodendrogliomas donde se evidencia que en los oligodendrogliomas la deleción de 1p y 19q es completa, mientras que en los demás subtipos se pueden observar deleciones intersticiales. Falsos positivos pueden ocurrir cuando dicha deleción intersticial es la complementaria para la sonda utilizada.. Abreviaciones: A (Astrocitoma); GB (Glioblastoma); OA (Oligoastrocitoma); O (Oligodendroglioma). (a) y (b) Tomado y adaptado de Susman y cols. 2006⁷⁷. (c) Tomado y adaptado de Durand y cols. 2010⁷⁸.

La presencia de la codelección 1p/19q, es reconocida como un factor pronóstico favorable y uno de los requisitos formales en el diagnóstico de los oligodendrogliomas en la clasificación de la OMS 2016^{28,52}. Se cree que esta deleción es un evento temprano en la oncogénesis de los oligodendrogliomas dado que se encuentra presente en resecciones iniciales de estos tumores, permanece incambiado entre el diagnóstico inicial y la recurrencia⁷⁹ y carece de diferencias intratumorales significativas⁸⁰. La codelección ocurre debido a una translocación no-balanceada completa del brazo corto del cromosoma 1 y del brazo largo del cromosoma 19 [t(1;19)(q10;p10)] que determina la creación de dos cromosomas derivados

der(1;19)(p10,q10) y der(1;19)(q10,p10) que posteriormente finaliza con la pérdida del cromosoma derivado que contiene el 1p y el 19q⁸¹.

La delección 1p/19q, completa o parcial, no es exclusiva de los oligodendrogliomas. Se ha descrito también en tumores de mama, pulmón, endometrio, ovario, neuroblastomas y carcinoma colorectal⁷⁷. Las alteraciones moleculares de las aberraciones cromosómicas repercute en oncogenes dominantes y genes supresores tumorales⁷⁶ que pueden influir sobre el fenotipo tumoral resultante. La razón por la cual la codelección 1p/19q se encuentra asociada a mejor pronóstico permanece sin resolverse, pero estudios indican que podría tener efecto sobre genes supresores tumorales cercanos, algunos asociados a la inducción de apoptosis mediada por receptores^{82,83}.

La presencia de esta codelección, inicialmente entendida como un factor pronóstico y actualmente como un criterio diagnóstico necesario para los oligodendrogliomas, puede ser evaluada mediante hibridación in situ fluorescente, FISH (del inglés *Fluorescent In Situ Hybridation*)⁸⁴ (Figura 13 (a) y (b)). Sin embargo, la falta de un criterio consensuado respecto del punto de corte al momento de evaluar los resultados y la presencia de problemas metodológicos varios que pueden devenir en resultados falsos positivos son elementos a tener en cuenta al momento del diagnóstico, lo que podría ser superado por análisis de arreglos de SNP (del inglés *Single Nucleotide Polymorphic Chromosomal Arrays*) (Figura 13(c))^{52,84-86}.

En resumen, el análisis de los distintos biomarcadores presentados previamente es una herramienta actual que se emplea para el diagnóstico integrado de gliomas (Figura 14).

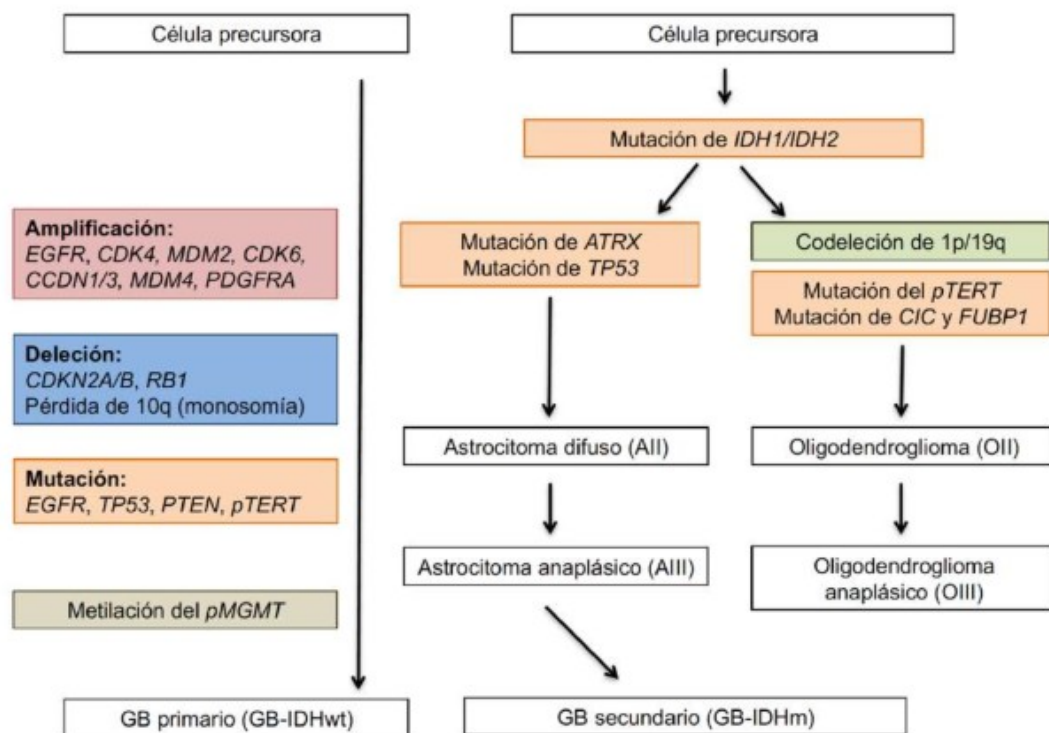


Figura 14 Resumen de los principales biomarcadores de gliomas que contribuyen a su diagnóstico integrado. Tomado de Carrato Moñino 2017⁸⁷.

VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE TGF β : GENERALIDADES

La superfamilia del factor de crecimiento transformante (TGF) está involucrada en diversos procesos celulares que participan en el crecimiento, desarrollo, diferenciación, homeostasis y cáncer^{88,89}. Esta familia está formada por polipéptidos extracelulares que comparten características estructurales, una señalización común mediada por receptores de membrana que son serin-treonin-quinasas y las proteínas Smad (del inglés *Small mothers against decapentaplegic*) como sustratos comunes^{88,89}.

TGF β , el miembro prototípico de dicha familia, es una citoquina multifuncional⁹⁰ que existe bajo la forma de cinco isotipos (TGF β 1-5), de los cuales en humanos solo se reconocen los tres primeros⁸⁹. Estas tres isoformas son codificadas por tres genes diferentes localizados en cromosomas distintos (19q13.2, 1q41 y 14q24.3) que actúan por la misma cascada de señalización dependiente de los receptores TGF β RI y RII⁸⁸. La expresión tisular de estas proteínas es diferencial siendo la isoforma TGF β 1 la más abundante en cartílago, hueso y piel, TGF β 2 en neuronas y astrogliá y TGF β 3 en el paladar y el tejido pulmonar⁹⁰. La síntesis de las diferentes isoformas implica varias etapas que culminan con la liberación al espacio extracelular de un complejo latente (TGF β latente o LAP del inglés *latency associated peptide*) que es activado por enzimas proteolíticas o secuestrado por proteínas que forman parte de la matriz extracelular⁸⁹.

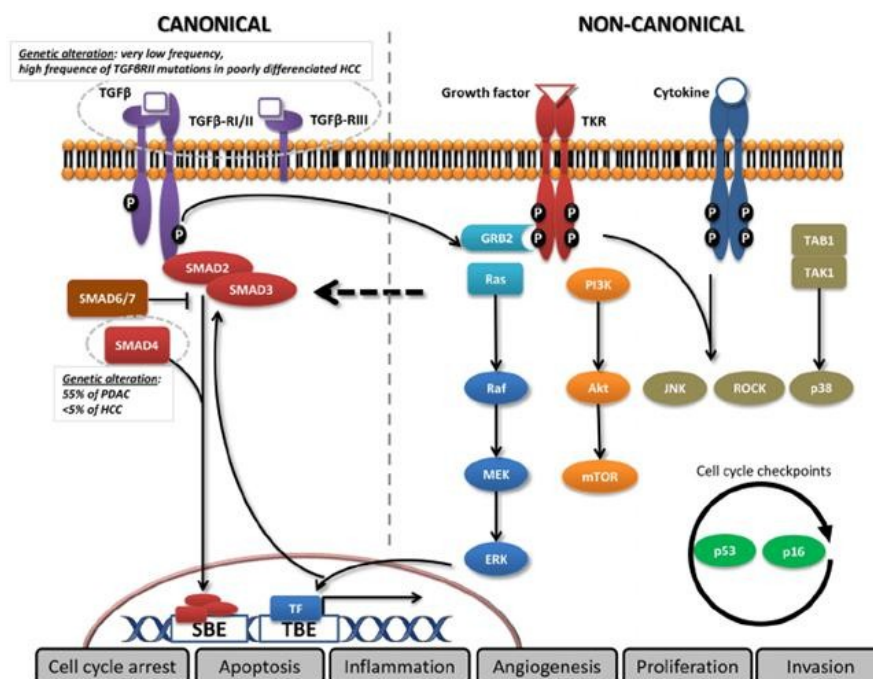


Figura 15 Imagen de los principales componentes de la vía TGF- β en sus formas canónica y no canónica. Se reconocen los ligandos (TGF β), receptores de membrana (TGF β RI, TGF β RII), coreceptores (TGF β RIII) y proteínas participantes de la señalización intracelular (Smad2, Smad3, Smad4, etc). Tomado y adaptado de Neuzillet y cols. 2013⁹¹.

La vía de señalización de TGF β es compleja, presenta múltiples niveles de regulación y participa en diversos procesos claves^{88,89} (Figura 15). El inicio de la misma comienza con la unión de TGF β a un dímero del receptor de tipo 2 (TGF β RII), expresado virtualmente en todos los tipos celulares⁹². A su vez, TGF β RII es una serin-treonin-quinasa capaz de fosforilar al receptor de tipo I (TGF β RI), con quien forma un heterotetrámero transmembrana que luego de ensamblarse activa la vía de señalización "canónica" (la vía dependiente de las Smads). TGF β RI y RII son los únicos receptores que permiten la transducción de señales dependiente de TGF β hacia el interior celular, aunque se describen otros receptores para

esta citoquina⁹³. Recientemente se ha descrito un tercer receptor (TGF β RIII, betaglicano) que no participa directamente en la vía de señalización pero facilita la activación de TGF β RI y II por lo que se considera “coreceptor” junto con otro miembro de la superfamilia de TGF (la endogleina)^{94,95}.

Las Smads constituyen una familia de proteínas cuyos genes están localizados en la región 21.1 del brazo largo del cromosoma 18 y que actúan como mediadoras de la *vía canónica* de TGF β ^{88,90}. El ensamblaje del complejo TGF β RII/ TGF β RI/TGF β activa la fosforilación de Smad2 y Smad3, las que luego formarán un complejo heteromérico con Smad4 y translocará al núcleo celular para interaccionar con varios factores transcripcionales modulando positiva o negativamente la expresión de los genes regulados por TGF β ^{90,96} (Figura 15, izquierda).

TGF β también puede activar diversas vías de señalización independientes de Smad (“*no-canónicas*”) entre las que se incluyen PI3K/AKT, MAP kinasas (ERK, JNK, p38), NF- κ B, Rho/Rac1, Cdc42, FAK, Src, Abl)⁹⁰, que actúan con una señalización transversal a nivel de las Smads, regulando diferentes funciones de TGF β relacionadas con un fenotipo celular invasor, metastásico y de proliferación celular⁹⁷ (Figura 15, derecha).

TGF β Y CÁNCER

La activación de la vía de TGF β ha sido estudiada en casi todos los cánceres epiteliales (próstata, mama, pulmón, colon, páncreas y piel) concluyendo que tiene funciones como supresor o como promotor tumoral dependiendo del estadio de la tumorigénesis⁹⁸ (Figura 16). Al estudiar por primera vez a la familia de TGF β s en múltiples tipos de cánceres, Korkut y colegas⁹⁹ demostraron que aproximadamente el 39% de los tumores evaluados presentaron alteraciones en la vía a nivel genómico y/o epigenético, existiendo una correlación positiva entre la sobreexpresión de la vía y el peor pronóstico^{99,100}.

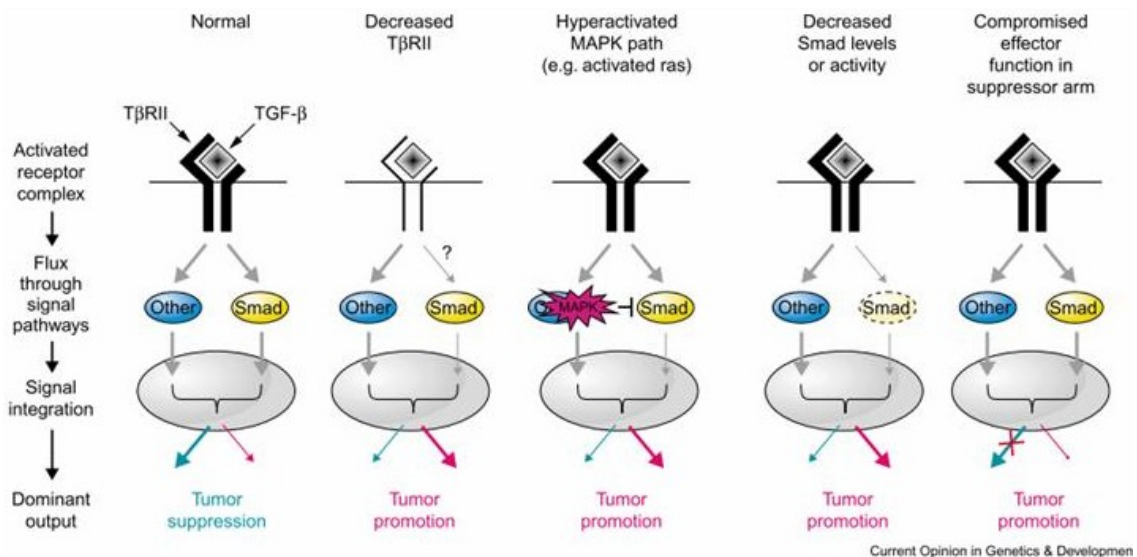


Figura 16 Rol de la vía TGF- β en la carcinogénesis. Se observa cómo el cáncer aprovecha esta vía mediante la activación de múltiples efectores así como de alteración estructural o cuantitativa de alguno de sus componentes que determinan la promoción tumoral. Tomado y adaptado de Wakefield y cols. 2002¹⁰¹.

En general, se describe un pasaje desde una respuesta antiproliferativa inicial producida por TGF β hasta el impulso de la tumorigénesis, lo que va acompañado de alteraciones genéticas secuenciales a lo largo del tiempo que estimulan el crecimiento, la expansión clonal y la acumulación de mutaciones en genes como PIK3CA, Smad4 y p53, que causan tumores más invasivos y metastásicos⁹⁸. Este cambio funcional

se conoce como la “paradoja del TGFβ”⁹⁵, indicando que los diferentes efectos biológicos desencadenados por la vía parecen ser contextuales incluso para un mismo tipo celular. Una de las posibles explicaciones indica que las respuestas diferentes inducidas por TGFβ pueden ser dependientes de los niveles de proteína (*complex dosage effect*), la cual es secretada por las células tumorales y es capaz a la vez de favorecer su migración, invasión y supervivencia en etapas más avanzadas de la tumorigénesis. A su vez, estos procesos estimulan el depósito de matriz extracelular y la fibrosis tisular que perturban las defensas inmunológicas, potencian la inflamación y estimulan la angiogénesis, ocasionando una alteración en el contexto celular (*context dependence*) que favorece la transición epitelio-mesenquimal y la metástasis^{101,102}.

TGFβ Y PROLIFERACIÓN CELULAR

Aunque inicialmente se pensó que TGFβ estimulaba la proliferación celular, al igual que muchos factores de crecimiento, surgieron numerosas evidencias que lo muestran como un regulador bifuncional capaz de inhibir o estimular la proliferación celular mediante mecanismos aún no totalmente entendidos¹⁰³. Más aún, cuando TGFβ fue aislado originalmente junto con el factor de crecimiento epidérmico (EGF), se reportó que se pudo inducir la transformación celular en algunas líneas celulares de fibroblastos¹⁰⁴. Sin embargo, TGFβ también actuó inhibiendo el crecimiento fundamentalmente en el linaje epitelial¹⁰⁵. Esta función dual parece tener una participación clave en la regulación de una variedad de eventos importantes durante el desarrollo normal, la fisiología y la patogénesis de enfermedades diversas entre las que se incluye el cáncer¹⁰⁶.

Expresión de TGFβ en tumores del SNC

Varios reportes muestran que en algunos tumores también hay sobreexpresión de TGFβ1⁹⁶. En gliomas, la expresión de TGFβ tiene un impacto en la mayoría de las características del fenotipo maligno y dos de sus tres isoformas se sobreexpresan en gliomas humanos en forma proporcional al grado histológico¹⁰⁷.

También se ha observado la expresión diferencial de los diferentes tipos de receptores de TGFβ en diversos tumores^{108–111}. La expresión de TGFβRI aumentó y mostró correlación positiva con la proliferación celular en tumores de ovario^{112,113} y los niveles detectados podrían estar estrechamente relacionados con la inducción y mantenimiento del fenotipo maligno^{114–116}. Mediante un análisis inmunohistoquímico, Yamada y cols¹¹⁷ mostraron aumento de la expresión de TGFβRI pero no de TGFβRII en 16 gliomas de los cuales uno era un oligodendroglioma y dos eran oligoastrocitomas. Evaluando glioblastomas, Song y colaboradores¹¹⁸ detectaron sobreexpresión de TGFβRII en correlación positiva con la expresión de otros receptores de factores de crecimiento como PDGFR, ERBR3 e IGF1R, lo que podría explicar la resistencia a las terapias dirigidas contra PDGDR. Un estudio proteómico encontró que hay una tendencia mayor a la presencia de mutaciones sin sentido o con efecto inactivador en el gen codificante para TGFβRII cuando se compara con el gen de TGFβRI^{102,111,119}. Los mismos autores proponen que TGFβRII podría tener un rol regulador de las propiedades de las células madre tumorales en los glioblastomas¹⁰⁰ y que su expresión estaría relacionada con la pérdida selectiva de la capacidad de TGFβ de inhibir la proliferación celular favoreciendo la transición epitelio-mesenquimal¹¹⁴. Estudios en gliomas de alto grado, que no incluyen oligodendrogliomas, también reportan aumento de la expresión de Smad4¹²⁰, sugiriendo activación de la vía canónica de TGFβ.

ROL DE TGFβ EN LA ANGIOGÉNESIS

La angiogénesis es un evento fundamental en la progresión maligna de los gliomas e involucra múltiples procesos que incluyen la proliferación endotelial, la migración, la formación de estructuras tubulares y la

reorganización de la matriz extracelular¹²¹. En general se postula que la angiogénesis exacerbada es un pre-requisito para que los tumores puedan crecer por encima de 1-2 mm¹²². La vía de TGFβ tiene un rol dual: induce un ambiente proangiogénico estimulando la angiogénesis asociada al tumor pero en circunstancias fisiológicas, TGFβ cumple una función anti-angiogénica^{97,123}. Este comportamiento dual, altamente influenciado por el contexto celular, se observa también en las moléculas corriente abajo como es el caso de Smad2 con un rol antiangiogénico mediado por una expresión diferencial de TSP-1 y sFlt-1 ó Smad3 que favorece la angiogénesis estimulando la expresión del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) de tipo A¹²⁴.

ROL DE TGFβ EN LA EVASIÓN INMUNE

Los tumores utilizan diversos mecanismos de escape a la vigilancia del sistema inmune entre los que se incluyen la pérdida de la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad para evitar el reconocimiento por los linfocitos T, la disminución o pérdida de antígenos asociados al tumor o de moléculas coestimuladoras requeridas para una eficiente interacción con los linfocitos T así como la secreción de citoquinas inhibitoras o de factores estimulantes que favorecen el crecimiento tumoral, entre los que se incluye TGFβ. TGFβ, junto con la interleuquina-10, es la citoquina con mayor efecto inmunosupresor. Aparte de promover la invasividad y la metástasis, TGFβ puede inhibir la expansión de los linfocitos CD8+ citotóxicos y de los linfocitos B, inhibir la expresión de receptores de IL-2 de alta afinidad inactivando a las células T, a las Natural Killer (NK) y a las células asesinas activadas por linfocinas¹²⁵. TGFβ también induce la diferenciación de células T reguladoras (Tregs), suprime la expresión de interferón γ, restringe la diferenciación de las células TH1 y favorece además la expresión de FOXP3¹²⁶. Este factor de transcripción determina y mantiene el programa funcional de células del linaje Treg a expensas de la diferenciación de las células Th1 lo que tiene implicaciones clínicas significativas ya que la infiltración de los tumores con Tregs se ha correlacionado con un mal pronóstico en pacientes con varios tipos de cáncer¹²⁶. TGFβ también favorece la angiogénesis inducida por VEGF y la activación de las proteasas de matriz (MMPs) que a su vez participan en la activación del TGFβ latente, generándose así un "ciclo vicioso" que se retroalimenta y permite el crecimiento del tumor mediante el establecimiento de un microambiente propicio para su desarrollo⁹⁰.

VÍA DE TGFβ COMO BLANCO TERAPÉUTICO EMERGENTE EN EL TRATAMIENTO DE GLIOMAS

El tratamiento actual para los gliomas está basado en un abordaje multiterapéutico compuesto por cirugía, radioterapia y tratamiento sistémicos (quimioterapias citotóxicas, terapia hormonal, inmunoterapia y terapias dirigidas)¹²⁷. Una opción reactiva al tratamiento en los gliomas GII de la OMS, favorece en oportunidades el seguimiento clínico imagenológico ("*watch and wait*") como única aproximación médica¹²⁸.

Dentro de los planes de neoadyuvancia de gliomas se destaca el uso de procarbazona, lomustina, vincristina o temozolamida¹²⁹, los que producen efectos adversos propios de los citostáticos: insuficiencia medular, toxicidad hepática y trastornos gastrointestinales¹³⁰. Además, para que estos tratamientos tengan impacto en la sobrevida se necesita que la resección inicial del glioma haya sido mayor al 90% de su volumen, situación que a veces no es posible debido a la proximidad del tumor a áreas elocuentes o topografías no resecables como el tronco encefálico^{131,132}.

Actualmente, estos abordajes se encuentran en revisión debido a que las conclusiones de los principales estudios en los que se basan fueron realizados previamente a la era IDH¹³³. En paralelo, la inmunoterapia es una herramienta de uso creciente para combatir el cáncer. Entre estos abordajes, el

empleo de citoquinas proinflamatorias recombinantes (IL-2, IFN- γ) es un intento para estimular terapéuticamente una respuesta inmune disminuida¹³⁴. TGF β aparece como un blanco terapéutico provisorio y los desafíos consisten mayormente en recuperar la pérdida de la capacidad de la supresión tumoral y al mismo tiempo eliminar o prevenir el efecto pro-oncogénico adquirido en estadios más tardíos¹¹⁴. Los resultados preliminares muestran que la inhibición genética o farmacológica de la vía de señalización de TGF β tuvo un beneficio terapéutico en modelos preclínicos en células tumorales de mama o el uso del inhibidor SD-208 de TGF β RI en animales inoculados con células de melanoma con tropismo óseo que causó una reducción de las lesiones metastásicas óseas que ocasionan estas líneas celulares¹³⁵.

A nivel de la vía de TGF β , la mayoría de los estudios son dirigidos a la proteína soluble mediante el uso de anticuerpos bloqueantes, pero pocos son dirigidos a sus receptores. Estudios recientes señalan que el silenciamiento de la expresión de TGF β RII puede inducir la senescencia en cultivos celulares de glioblastoma y algunos fármacos dirigidos contra el TGF β RI están bajo análisis en modelos preclínicos¹³⁶.

No obstante, el potencial terapéutico de TGF β debe ser considerado con precaución. En primer lugar, la inhibición sistémica de la vía puede generar efectos colaterales, ya que esta vía es de vital importancia en los procesos homeostáticos tisulares y, por otro lado, las respuestas inducidas dependen del contexto celular. Las células tumorales de mama evaden las señales de inhibición del TGF β conservando intactos a los miembros de la ruta favoreciendo la función prometastásica de la citoquina. En concordancia con estos resultados, el uso de un péptido inhibidor de TGF β en un modelo de carcinoma de células grandes demostró una reducción modesta de las metástasis óseas, por lo que los resultados son en principio promisorios pero muy primarios¹³⁷.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Dado que se ha demostrado que TGF β modula positivamente la transición epitelio-mesénquimal, que la sobreexpresión de esta citoquina ha sido reportada en gliomas en correlación directa con su grado y que la proliferación celular aumenta con el grado tumoral, la hipótesis a validar en este trabajo de maestría es la siguiente: durante el proceso de transformación de oligodendrogliomas existe una correlación positiva entre la activación de la vía de TGF β y el aumento de la proliferación celular.

OBJETIVO GENERAL

Aportar al conocimiento del estado de la vía de TGF β y su relación con la proliferación celular en oligodendrogliomas difusos y anaplásicos clasificados mediante el diagnóstico integrado.

Optimizar diversos marcadores y abordajes metodológicos que tiendan a instalarse en el diagnóstico integrado como herramienta de rutina en el Hospital de Clínicas y otros centros.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Conocer la frecuencia de oligodendrogliomas en el archivo de muestras del Departamento y Cátedra de Anatomía Patológica del Hospital del Clínicas de UdelaR.
2. Caracterizar la expresión de las marcas moleculares prototípicas de los oligodendrogliomas en las muestras aptas para estudio.
3. Conocer el estado de la vía de TGF β en oligodendrogliomas difusos y anaplásicos y determinar si existe una correlación con la proliferación celular.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para cumplir el primer objetivo específico se realizó el relevamiento manual de casos del archivo de Anatomía Patológica entre enero de 2014 y marzo de 2020 y la selección de casos aptos para el análisis. Para cada caso se obtuvo el diagnóstico anatomopatológico, sexo, edad y topografía de la lesión. Luego se analizó la disponibilidad de material biológico de acuerdo a los criterios del Comité de Ética de Investigación del Hospital de Clínicas y se revisaron las láminas histológicas teñidas con hematoxilina-eosina o se realizaron y tiñeron láminas a partir de los bloques cuyo acceso fue permitido. Los tumores fueron clasificados según los criterios morfológicos tradicionales y graduados en base a la atipia, mitosis, necrosis e hiperplasia vascular. Se seleccionaron los casos de oligodendrogliomas con criterios morfológicos estrictos.

Para realizar el segundo objetivo específico, se optimizaron los protocolos para reconocer las marcas moleculares en controles positivos de muestras humanas. Luego, estos abordajes se realizaron en todas las muestras de oligodendrogliomas seleccionadas para su estudio: FISH para detectar la codeleción 1p/19q e inmunohistoquímica para evidenciar la inmunoreactividad para IDH1 mutada, p53 no mutada (wt) y ATRX no mutada (wt).

Para conocer el estado de la vía de TGF β y determinar si existe una correlación con la proliferación celular en oligodendrogliomas difusos y anaplásicos, mediante inmunohistoquímica se analizaron las marcas para los receptores I y II de la vía de TGF β , de Smad4 como sustrato común de la misma y la señal de Ki67 para calcular los coeficientes de proliferación celular en cada muestra, distinguiéndose entre el núcleo (*core*) y frente del tumor tanto en las células tumorales como endoteliales. Los resultados obtenidos para cada variable se graficaron y se analizaron de a pares.

MATERIALES Y MÉTODOS

TEJIDOS HUMANOS

Todas las muestras provinieron del archivo de Anatomía Patológica del Hospital de Clínicas, incluyendo los casos de oligodendrogliomas seleccionados para su estudio y los controles positivos para la optimización de cada uno de los marcadores analizados. Los controles positivos provinieron de tejidos humanos normales provenientes de resecciones quirúrgicas de colon, testículo, placenta, páncreas y riñón. El material proporcionado estaba fijado en formalina al 10% en buffer fosfato 0.1M, pH 7.4 e incluido en parafina. Se trabajó con muestras que cumplieron requisitos mínimos de preservación.

REACTIVOS E INSUMOS VARIOS

Tabla 1 Kits para hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

Sistema	Fabricante	Catálogo
ZytoLight glioma 1p/19q probe set	Zytovision	Z-2272-20
ZytoLight FISH tissue implementation Kit	Zytovision	Z-2028-20
EnVision™ + Dual Link System-HRP	DAKO	K4063; K4061
Vectastain® ABC reagent (ratón)	Vector Laboratories	PK-6102

Tabla 2 Anticuerpos primarios empleados

Anticuerpos primarios	Tipo	Clona	Concent.	Huésped	Fabricante y número de catálogo
Marcador mutación específico					
IDH1 R132H	Monoclonal IgG2a	H08	1.5 µg/mL	Ratón	Masterdiagnostica / MAG-000475QD
Marcadores de localización nuclear					
ATRX	Monoclonal, IgG1/k	AX1	2 µg/mL	Ratón	Dianova / GmbHDIA-AX1
p53	Monoclonal, IgG2b/k	DO-1	---	Ratón	Bio SBB / SB 5842*
Ki67	Monoclonal, IgG	MIB-1	----	Ratón	Bio SBB / SB 5709*
Marcadores de la vía TGF-β					
Marcadores de expresión citoplasmática y/o nuclear					
Anti-Smad2	Monoclonal IgG2b	1C12	48 µg/mL	Ratón	Hybridoma Bank / PCRP-SMAD2-1C12
Anti-Smad2	Monoclonal IgG2c	1B10	16 µg/mL	Ratón	Hybridoma Bank / PCRP-SMAD2-1B10
Anti-Smad4	Monoclonal IgG2a	1D12 S	13 µg/mL	Ratón	Hybridoma Bank / PCRP-SMAD4-1D12S
Anti-Smad4	Monoclonal IgG2	1G11 S	25 µg/mL	Ratón	HybridomaBank / PCRP-SMAD3-1G11S
Anti-Smad4	Monoclonal, IgG1	BSB-63	----	Ratón	Bio SBB / SB 3208*
Marcadores de localización de membrana					
Anti-TGFβRI	Policlonal	-	10 µg/mL	Conejo	Abcam / Ab235178
Anti-TGFβRII	Policlonal	-	10 µg/mL	Conejo	Abcam / Ab186838

* La hoja de datos del fabricante SB Bio no proporciona la concentración de anticuerpo, solo indica diluciones sugeridas. En estos casos los anticuerpos originales se diluyeron 1:100.

Tabla 3 Sistemas de revelado para inmunohistoquímica

Sistema	Fabricante	Catálogo
EnVisionTM+ Dual Link System-HRP	DAKO	K4063; K4061
Vectastain® ABC reagent (ratón)	Vector Laboratories	PK-6102
Vectastain® ABC reagent (conejo)	Vector Laboratories	PK-6101

METODOLOGÍA

APROBACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN

Esta propuesta fue presentada y aprobada por el Comité de Ética de Investigación del Hospital de Clínicas el 28 de Agosto de 2019.

REVISIÓN DEL ARCHIVO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA Y SELECCIÓN DE CASOS

Se procedió al estudio del archivo en papel desde enero de 2014 a marzo de 2020, dado que no se posee un sistema informático para la búsqueda de casos. En primera instancia se seleccionaron los informes vinculados a neuropatología recabándose todos los diagnósticos finales de tipo neoplásico realizando una tabla sistematizada con los datos anonimizados de cada paciente, recabándose: sexo, edad, diagnóstico patológico y topografía de la lesión. El manejo de datos personales se realizó resguardando la estricta confidencialidad tal como lo establece la Ley 19.286.

OBTENCIÓN DE CORTES PARA ESTUDIOS DE H&E, IF, IHQ Y FISH

El material disponible estaba fijado y en bloques de parafina. Para la realización se tomaron hasta 8 láminas silanizadas conteniendo hasta 3 cortes por lámina, lo que representó menos del 1% del material total disponible para cada paciente.

Los cortes seriados de 5 µm se obtuvieron con un micrótomo Finesse E+ (ThermoScientific), fueron recogidos en un baño de flotación (Latei SRL) de agua destilada a 37°C y montados en portaobjetos de vidrio. Para la tinción con hematoxilina-eosina (H&E), los cortes se levantaron en portaobjetos convencionales, mientras que para el resto de las técnicas se utilizaron portaobjetos cargados (StarFost® Waldemar-Knitterl). Luego del corte, los portaobjetos se colocaron en placas térmicas (Sakura, PS-51) a 60°C durante 12 horas para su secado y adhesión.

TINCIÓN CONVENCIONAL CON H&E

Esta técnica es la más empleada en histología convencional y una de las más antiguas. Se considera que proporciona una visión muy detallada del tejido que frecuentemente es suficiente para alcanzar un diagnóstico basado en la organización (arquitectura) y la apariencia celular (citología). Esta técnica resulta de la combinación de la hematoxilina y la eosina. La hematoxilina en sí misma no es un colorante y debe ser oxidada a hemateína, la que luego formará un complejo con un mordiente como lo pueden ser los iones de aluminio, generando la hemateína de alumbre o hemalumbre. El hemalumbre es un colorante básico con grupos catiónicos que se emplea para colorear las estructuras celulares ácidas con un color azul-púrpura. En tanto la eosina es un colorante ácido con grupos fuertemente aniónicos y en general, tiñe de rosado estructuras proteicas básicas presentes en los citoplasmas, las fibras del

intersticio y las membranas basales. Se han descrito diversas variedades de protocolos y en nuestro caso se aplicó el protocolo estándar referido en la literatura clásica¹³⁸:

- 1- desparafinado empleando dos inmersiones sucesivas de 20 min en xilol y a la hidratación con series decrecientes de etanol (100%, 90%, 70%, 30%), repitiendo dos veces cada paso durante 5 min cada uno;
- 2- lavado de las secciones con agua destilada;
- 3- incubación durante 10 minutos con solución comercial de Hematoxilina de Harris;
- 4- lavados bajo el agua del grifo para eliminar el exceso de colorante;
- 5- inmersión en alcohol ácido (70% de etanol en 1% de ácido acético) para acentuar el contraste (virado) o utilizando agua de grifo;
- 6- enjuague 2 veces con agua del grifo y 1 vez con agua destilada durante 2 min;
- 7- incubación con eosina durante 45 segundos;
- 8- lavados y deshidratación progresiva: 3 veces durante 5 minutos con etanol 95%, otras 3 veces con etanol 100% (5 minutos) y 3 veces con xilol durante 2 minutos cada una;
- 9- montaje con bálsamo de Canadá.

FISH PARA DETECCIÓN DE LA CO-DELECIÓN 1p/19q

Para la determinación cualitativa de la delección de los cromosomas y regiones 1p36.31 así como 19q13.32-13.33 se optimizó un protocolo empleándose dos kits comerciales del mismo proveedor que permitieron el manejo y reclutamiento de material fijado en formol e incluido en parafina y la hibridación con las sondas de ADN específicas (Tabla 1). El protocolo empleado fue el sugerido por el fabricante con modificaciones menores.

La secuencia realizada fue la siguiente:

- 1- desparafinado con xilol y re-hidratación en series decrecientes con etanol 100°, 90°, 70° y agua ultrapura durante 10 minutos cada uno;
- 2- recuperación antigénica mediante inmersión en una solución de citrato de sodio 10 mM, pH 6 a 98°C durante 20 minutos;
- 3- 3 lavados en agua ultrapura y digestión con pepsina 0.1% durante 30 minutos en estufa húmeda a 37°C;
- 4- verificación del grado de digestión según lo descrito por Zhang y cols. 2017¹³⁹ (Figura 17). En caso de requerirse mayor tiempo de digestión, se fueron añadiendo tiempos de 5 minutos hasta obtener un estado óptimo de digestión reconocido por la morfología nuclear y la ausencia progresiva de detritos celulares;
- 5- lavados con buffer citrato y deshidratación completa;
- 6- cuando las muestras se observaron completamente secas se aplicó el producto para disminuir la fluorescencia de fondo (ZyBlack™ Quenching Solution) durante 30 minutos a temperatura ambiente;

7- se lavó con buffer de lavado proporcionado por el fabricante, las láminas se secaron en estufa a 37°C y en cuarto oscuro se colocó en uno de los cortes la solución que contiene la secuencia que mapea el 19p13.3 (verde) y 19q13.32-q13.33 (rojo). En otro de los cortes se agregó la solución que contiene las secuencias que mapean 1p36.31 (rojo) y 1q25.32 (verde);

8- se superpuso un cubreobjetos limpio, se selló con Fixogum® y se colocó en horno de hibridización con el siguiente programa: desnaturalización a 75°C durante 10 minutos y luego incubación a 37°C durante 18 a 24 horas para permitir la hibridización;

9- se lavó con buffer con detergente varias veces, se deshidrató con soluciones alcohólicas ascendentes y se montó con una solución comercial conteniendo DAPI/DuraTec;

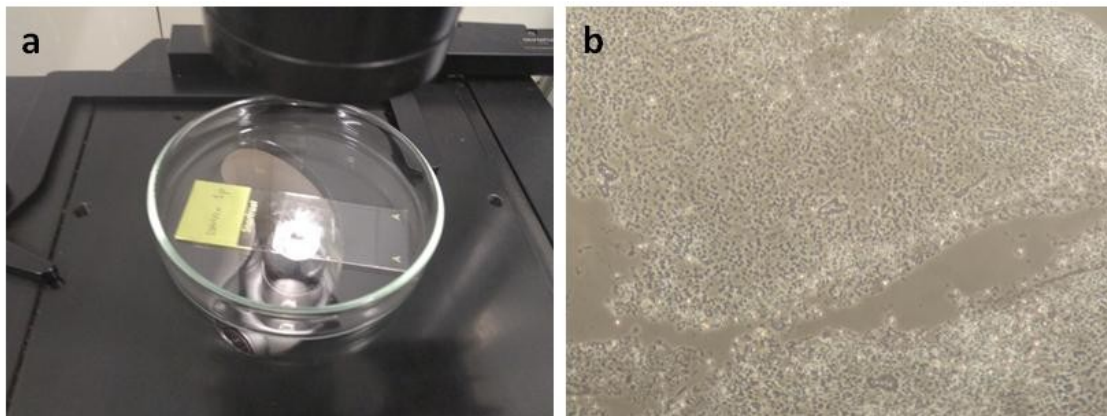


Figura 17 Seguimiento en simultáneo para optimizar el tiempo de digestión. (a) Se utilizó un microscopio Olympus CK61 utilizando el condensador lo más alejado posible del preparado para aumentar la refringencia y lograr visualizar los contornos celulares y nucleares así como la sustancia intersticial (b).

10- las láminas fueron conservadas en heladera a 2-8°C hasta su evaluación.

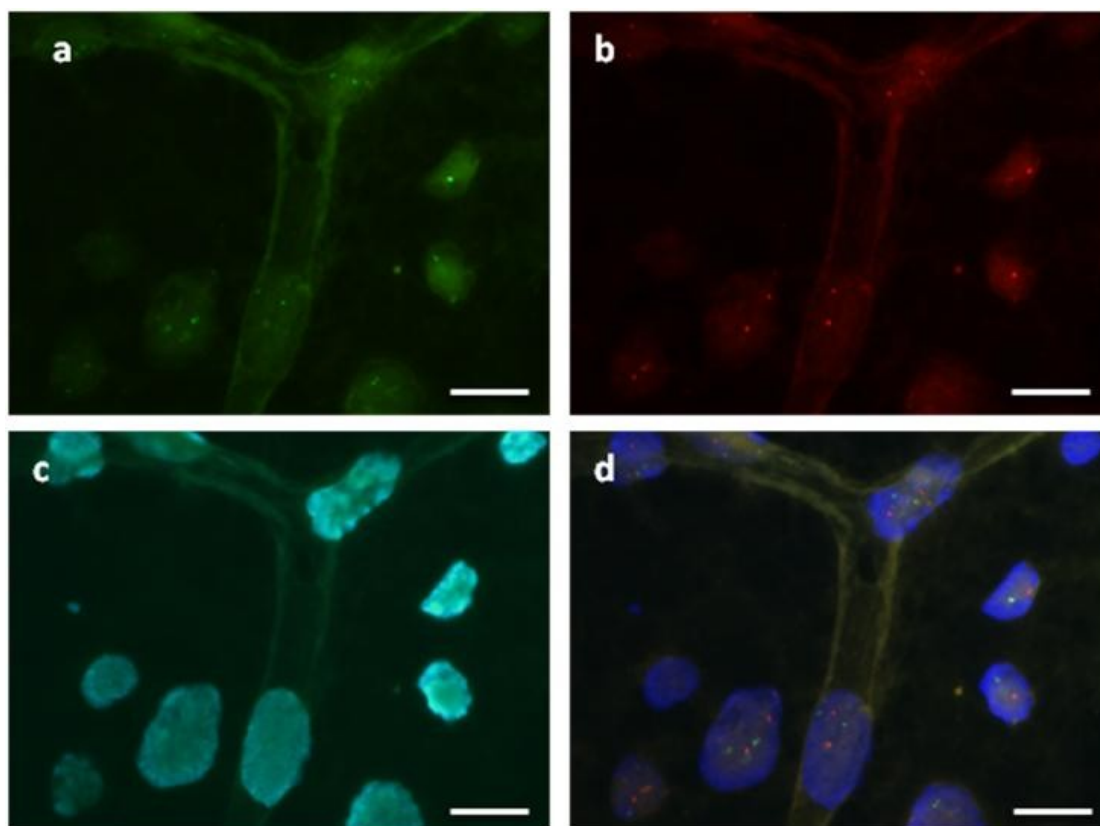


Figura 18 Imágenes representativas obtenidas para cada uno de los canales de fluorescencia. (a) FITC, (b) Cy3 y (c) DAPI. (d) Imagen de los tres canales combinados utilizando una macro de fusión automática en ImageJ. De este modo se logra observar en la misma imagen los núcleos (azul) con las marcas para los centrómeros (verde) y la sonda diana (1p o 19q) en rojo. Escala: 15 μ m.

Los cortes montados se evaluaron con un microscopio dual de campo claro/fluorescencia Olympus BX51 y las imágenes se obtuvieron con una cámara Olympus DP72 en modo manual con una sensibilidad ISO200 para los filtros DAPI (azul), FITC (verde) y Cy3 (rojo). Se tomaron imágenes suficientes para analizar al menos 100 núcleos completos no solapados para cada caso. En el caso de sospecha de presencia de un patrón de marca no convencional, se obtuvieron imágenes adicionales para contar 150 a 200 núcleos. La técnica se consideró adecuada cuando se pudo evaluar al menos un 75% de áreas con marcación para las sondas utilizadas y contar con controles internos positivos (endotelio o linfocitos) con una relación 2R2G conservada (Figura 19).

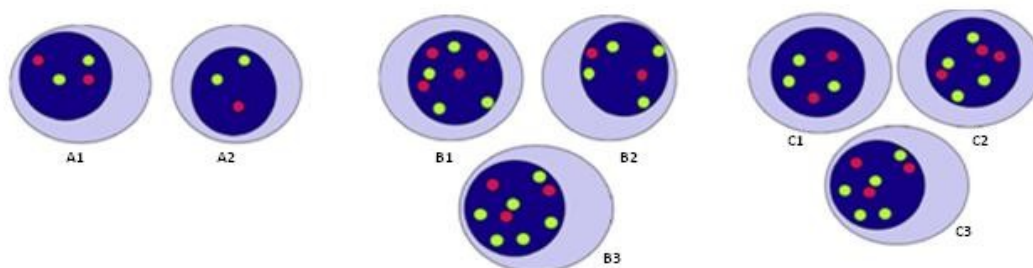


Figura 19 Esquema patrones posibles de señales centroméricas (verde) y de la región evaluada (rojo). Tomado y adaptado de Pinkham y cols. 2015⁷⁹.

Para la confección de las imágenes con los tres canales se utilizó ImageJ (National Institute of Health, ImageJ 1.53c) y una *macro*¹ que permitió de manera automatizada la superposición de los canales DAPI, FITC y Cy3 adquiridos en diferentes imágenes (Figura 18).

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE IMÁGENES DE FISH

El análisis y la interpretación de las imágenes se realizó aplicando los criterios definidos por Duvaly colegas¹⁴⁰ y por la Sociedad Internacional de Oncología Pediátrica (ISPO)¹⁴¹. Para cada caso se analizó la marcación con las sondas roja (R) y verde (G) utilizando los siguientes métodos:

1- se realizó el conteo manual de las observaciones individuales de cada núcleo para cada paciente;

2- se ingresaron los datos a una planilla Excel realizada en base a los criterios citados previamente (Figura 18). La conclusión sobre los resultados se obtiene mediante la conjunción de estos dos métodos:

- A- *Criterio diagnóstico de la relación R/G (rojo/verde)*: se contó la totalidad de señales rojas y verdes para cada caso y se calculó la relación. De acuerdo a los criterios de Duval y de la ISPO, se consideraron 3 resultados: “deleciónado” para $R/G \leq 0.8$, “normal” para R/G entre 0.8-1.15 y “no-balanceado” si R/G es ≥ 1.15 ;
- B- *Criterio de combinaciones*: se definió como “deleción simple” cuando se observaba una única o ninguna señal roja y la relación $R/G < 0.5$ (Figura 19 A2); “deleción relativa” cuando se observaba una $R/G < 0.5$ en el contexto de una polisomía (ej. 4/2, 6/3, B1-3); “normal” cuando se observaba una relación R/G intacta (Figura 19 A1); “no balanceado” cuando se observaba cualquier combinación con $R/G > 0.5$ (Figura 19 C1-3). Los casos de combinaciones 0R0G, 1R0G y 0R1G se consideraron como “no clasificables” de acuerdo con Duval y cols.¹⁴⁰.

En casos de diferencias entre los métodos, si uno determina “deleción” y el otro “normal”, el caso se concluye como “deleciónado”. En caso de “no-balanceado” por un método y “normal ó deleciónado” por el otro el caso se concluye como “no-balanceado”. En caso de que por ambos métodos se concluye que son ambos normales o deleciónados, se considera como normal y deleciónado respectivamente.

La Figura 20 muestra la hoja de Excel formada con la clasificación de los tipos en función del número de marcas verdes o rojas para cada deleción.

¹ Obtenida de https://imagej.nih.gov/ij/macros/Batch_RGB_Merge.txt

A	1p			
	Núcleo	G (1q25.3)	R (1p36.31)	Signal pattern (Normal; Delección absoluta; Delección relativa; Patrón no balanceado; Unclassified)
	1	2	0	Simple deletion
	2	2	0	Simple deletion
	3	2	1	Simple deletion
	4	1	1	Unclassified
	...	...	...	...
	96	2	1	Simple deletion
	97	2	2	Normal
	98	2	0	Simple deletion
	99	2	1	Simple deletion
	100	2	1	Simple deletion
	Total	164	97	
	N°IMAGEN representative 25/31			
B	Ratio R/G			
	Ratio R/G	0,591463415	DELETION	Valor referencia: ≤0.00 Delecionado: 0.00-1.15 Normal: 2.1.15 Poliploidia (estado no-balanceado)
C	Pattern signal			
		Absoluto	%	Valor referencia*
	Normal	4	4	
	Imbalance	3	3	Normal: < 30%
	Simple deletion	53	53	
	Relative deletion	6	6	
	TOTAL DELETION	59	59	Delección sí: > 55%
	Unclassified	34	34	Normal: 10-15%

Figura 20 Tabla confeccionada en Excel para el cálculo del estado de codelección 1p/19q. Ejemplo utilizado evaluación de 1p. (A) Se registró para cada núcleo la cantidad de señales verdes (G) y rojas (R) y se determinó el patrón de señal como normal, delección balanceada, delección relativa, no-balanceado o inclasificable de acuerdo con el algoritmo reportado por Duval y cols. 2015. (B) Se calculó la relación R/G utilizando los valores de referencia de la literatura. (C) Se determinó el porcentaje para cada patrón y el patrón predominante.

INMUNOHISTOQUÍMICA

La inmunohistoquímica en sentido amplio abarca muchos métodos utilizados para identificar la presencia de constituyentes moleculares de los tejidos y células (antígenos) con anticuerpos específicos que pueden ser visualizados mediante una reacción química¹⁴². La técnica se basa en la especificidad de la unión anticuerpo con su antígeno a nivel microscópico²³. Para ser empleada como herramienta diagnóstica, la inmunohistoquímica requiere varias fases¹⁴²:

- (1) preparación de la muestra: incluye fijación, procesamiento, recuperación antigénica, bloqueo de posibles uniones no-específicas y bloqueo de la actividad endógena enzimática
- (2) incubación con anticuerpo primario específico en condiciones que favorezcan la reacción antígeno-anticuerpo y la aplicación de un sistema de revelado y/o contratinción;
- (3) interpretación y cuantificación de resultados.

Particularmente en materiales fijados en formol e incluidos en parafina, el requisito de recuperación antigénica es necesario para que las regiones de las proteínas que pueden ser reconocidas por el

anticuerpo (epítopes) puedan interactuar con sus contrapartes. El mecanismo por el cual se aumenta la antigenicidad de los epítopes se denomina “recuperación antigénica” existiendo múltiples mecanismos¹⁴³. Los más comunes requieren de la inmersión del preparado en una solución inorgánica próximo a los 98°C utilizando buffer de citrato o EDTA para la regulación y determinación de pH a 6 y 9 respectivamente. De manera alternativa se puede utilizar digestión enzimática (tripsina, pepsina, quimiotripsina, proteinasa K) destacándose que ninguno de los protocolos es capaz de recuperar el 100% de la antigenicidad del material y que algunos epítopes son extremadamente sensibles al tiempo de fijación en formaldehído¹⁴³.

PROTOCOLO BÁSICO

Con adaptaciones menores para cada caso en particular, el protocolo empleado fue el siguiente¹⁴⁴:

- 1- desparafinado con xilol y re-hidratación en series decrecientes con etanol 100°, 90°, 70° y agua ultrapura durante 10 minutos cada uno;
- 2- recuperación antigénica empleando citrato de sodio 10 mM , pH 6 ó Tris-EDTA 1 mM, pH 9, a 98°C durante 20 minutos;
- 3- 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS;
- 4- bloqueo de peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno (3%) durante 20-30 minutos;
- 5- 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS;
- 6- incubación con anticuerpos primarios específicos (Tabla 2) en las diluciones determinadas en forma previa durante 18 horas en cámara húmeda a 4 °C;
- 7- 3 lavados con PBS (10 minutos cada uno) e incubación con anticuerpo secundario biotinilado durante 1 h a temperatura ambiente;
- 8- lavados y revelado utilizando DAB como cromógeno*;
- 9- contratinción con hematoxilina y virado;
- 10- deshidratación secuencial y montaje con DPX.

*El empleo de esta técnica de revelado fue fundamental para reconocer la histoarquitectura lo que resulto fundamental para identificar el core y el frente tumoral y para el análisis de datos. La marca del cromógeno se observó como un precipitado marrón de intensidad variable mientras que los núcleos contrateñidos con hematoxilina se observan con un color violeta-azulado pálido.

VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA

En todos los casos, para optimizar el protocolo se utilizó material de tejidos no patológicos procedente de páncreas, placenta, riñón, testículo o colon. En primer lugar se optimizaron los protocolos de recuperación antigénica con citrato 10 mM, pH 6.0 o Tris-EDTA 1 mM, pH 9.0 desde 20 a 40 minutos a 98°C. En general se optó por la recuperación antigénica ácida, variando los tiempos de recuperación en función del tiempo de fijación que presentaba la muestra. En segundo lugar, se determinó la concentración de trabajo, realizando 3 diluciones diferentes de cada anticuerpo en el rango de las sugeridas por el fabricante. Se optó por la dilución que brindó mejor relación entre la señal específica y la de fondo. Las pruebas de controles positivos y negativos de anticuerpos en cada muestra se realizaron

en una sola lámina dado el número acotado de las mismas. En todos los casos, se compararon los resultados obtenidos con los descritos en la hoja de datos del anticuerpo y con los presentados en el Atlas de Proteínas Humanas (<https://www.proteinatlas.org/>).

OBSERVACIÓN DE PREPARADOS Y DOCUMENTACIÓN FOTOGRÁFICA

Los cortes montados se visualizaron con un microscopio dual de campo claro/fluorescencia Olympus BX51 provisto de una cámara Olympus DP72 adquiriendo las imágenes con el software Cell-F®. Si el preparado lo permitía se tomaron de 1 a 5 campos del núcleo (core) y del frente tumoral. Las imágenes de las regiones representativas fueron guardadas en formato .tiff y posteriormente procesadas en ImageJ.

CRITERIOS INTERPRETATIVOS DE LOS RESULTADOS

Basados en la práctica de anatomía patológica y bajo la supervisión del personal del departamento se delimitaron los criterios de interpretación de resultados para cada marcador analizado. Se utilizaron además escalas semicuantitativas de uso validado en anatomía patológica en las áreas más representativas^{145,146}.

DELIMITACIÓN DEL ÁREA TUMORAL Y DEL ÁREA DE INFILTRACIÓN

No existen herramientas para delimitar con precisión lo que se entiende por área de infiltración ni cuál es su extensión óptima. Dentro de las definiciones aplicadas para frente/borde tumoral se encuentra la del grupo de Bastola y cols. (2020)¹⁴⁷ que la define como áreas donde las células tumorales son escasas dentro del parénquima cerebral predominantemente normal y con pocas reacción de gliosis; mientras que el núcleo tumoral corresponde a aquellas zonas con mayor densidad celular (hipercelulares) con predominio absoluto de células tumorales, acompañado de cambios vasculares y necrosis¹⁴⁷.

Nuestro estudio consideró frente de invasión cuando la cantidad de células tumorales fue menor al 20% mientras que el núcleo o core tumoral presentaba al menos 90% de celularidad tumoral (Figura 21). La estimación visual de la celularidad se realizó empleando escalas visuales analógicas validadas por el Colegio Americano de Patología¹⁴⁸.

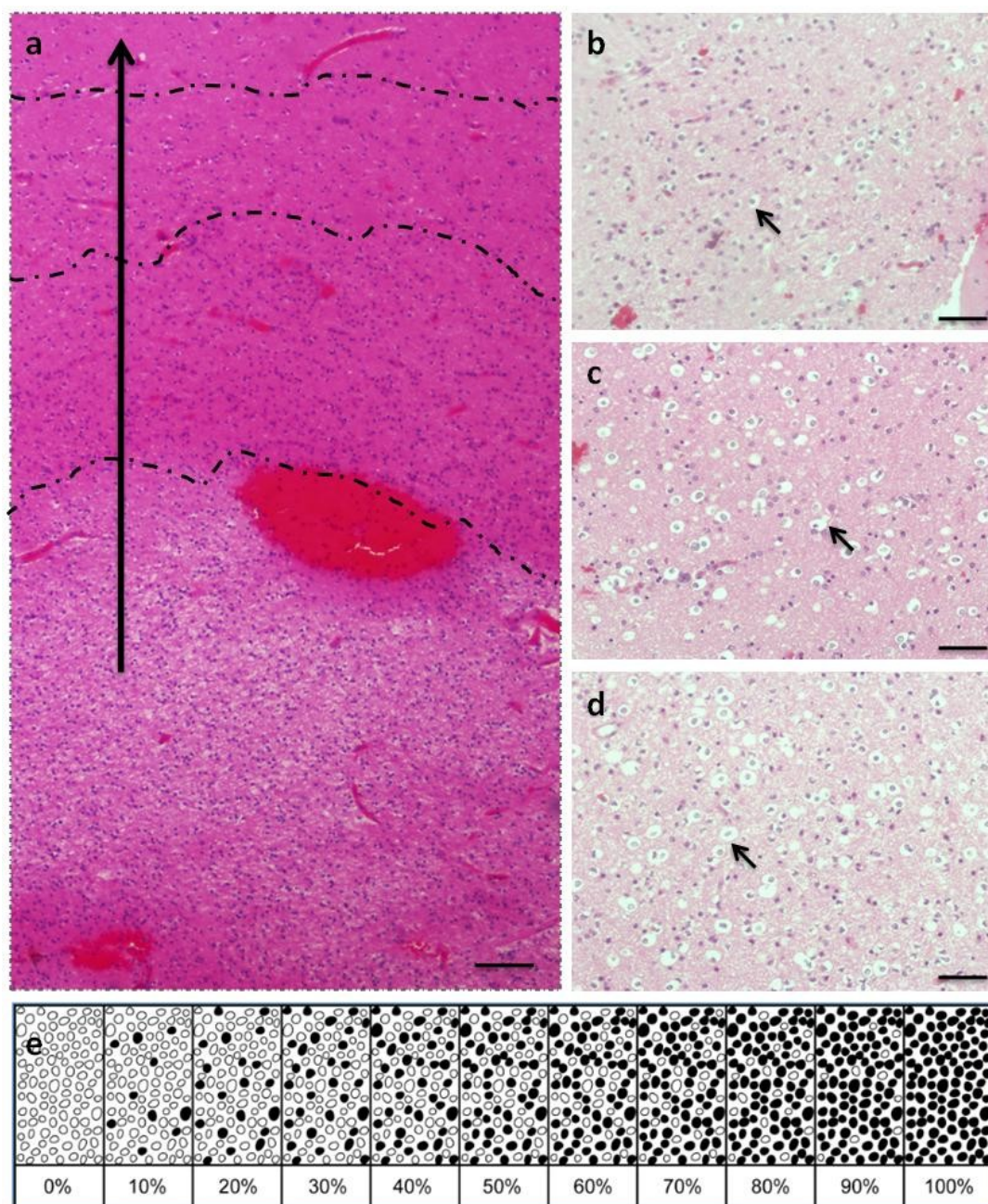


Figura 21 Delimitación del núcleo (core) y del frente tumoral. (a) Imagen con H&E de uno de los casos estudiados en esta tesis a aumento topográfico que muestra el core tumoral en la porción inferior y un gradiente decreciente hacia el borde superior pudiendo delimitarse áreas de celularidad cualitativamente diferentes (líneas punteadas). Escala: 100 μ m. (b), (c) y (d) ejemplos de celularidad tumoral estimada en 20-25%, 50% y 70-80% respectivamente de la misma imagen pero a mayor aumento (células tumorales indicadas con una flecha negra). Escala: 50 μ m. (e) Escala visual analógica empleada por el Colegio Americano de Patólogos¹⁴⁸.

CRITERIOS SEMICUANTITATIVOS EMPLEADOS PARA EVALUAR CADA MARCADOR EN PARTICULAR

MARCADOR MUTACIÓN ESPECÍFICO - IDH1 R132H

La interpretación de estos resultados se realizó de acuerdo a las recomendaciones del comité de investigación de la Confederación Europea de Sociedades de Neuropatología⁶⁸. La categorización sugerida es la siguiente:

1. Mutación IDH1 R132H identificada: cuando se observa positividad completa o incompleta intensa a nivel citoplasmático, pudiendo presentar difusión nuclear;
2. Mutación IDH1 R132H no identificada: cuando no se observa marcación positiva con los anticuerpos validados que reconocen esta mutación prototípica y
3. No concluyente: abarca todas situaciones en las cuales se sospechan problemas pre-analíticos o técnicos.

MARCADORES DE LOCALIZACIÓN NUCLEAR

KI67 – MARCADOR DE PROLIFERACIÓN CELULAR

Este antígeno es una proteína codificada por el gen MKI67 en humanos que fue identificada por el anticuerpo monoclonal Ki67 generado inmunizando ratones con núcleos de la línea L428.10 de linfoma de Hodgkin¹⁴⁹. Ki67 es un marcador de proliferación celular que se expresa en las fases G1 del ciclo celular y persiste durante las fases S, G2 y M, en estrecha relación con la proliferación celular. Ki67 no se expresa en etapas tempranas de G1 ni en G0¹⁵⁰. Debido a su asociación con la proliferación celular, la detección de Ki67 por inmunohistoquímica es una herramienta útil para evaluar el índice de proliferación de un tumor²³.

Hay diversos métodos para determinar el índice Ki67 manualmente y de manera automatizada, con buena concordancia entre ellos. Por esta razón se eligió un procedimiento de conteo que es el aplicado en tumores neuroendócrinos y ha sido validado por la OMS¹⁵¹. Se tomaron fotografías de las muestras y se realizó el recuento de aproximadamente 100 a 500 núcleos sugestivos de ser tumorales. El índice resultó del porcentaje de núcleos que presentaban la marca con respecto al total.

ATRX

La interpretación final para este marcador se realizó de acuerdo a Hattab y cols.¹⁵² considerándose:

- a) “presencia de expresión”: la marcación se considera válida si se confirma la presencia de controles internos positivos en linfocitos de talla pequeña y en el núcleo de las células endoteliales. La marcación en más del 10% de las células tumorales es indicador de “presencia de expresión”¹⁵³;
- b) “ausencia de expresión”: cuando la neoplasia carezca de expresión de este marcador y haya controles internos positivos en sus adyacencias. Recordar que este marcador es sumamente sensible a la fijación y el efecto de electrofulguración⁵²;
- c) “no concluyente”: los casos de dudosa calidad¹⁵².

La expresión de esta proteína se evalúa a nivel nuclear tanto en intensidad como en porcentaje de células que presenten marca de intensidad moderada a fuerte. Para la determinación del porcentaje de expresión nuclear se utilizó el sistema visual analógico empleado con Ki67 en células tumorales.

La categorización de las marcas en función de la intensidad se realizó de acuerdo a Yemelyanova y cols.¹⁵⁴ y es la siguiente:

- a) “patrón mutado”: corresponde a aquellas situaciones en las que existe una ausencia de marcación o en su contraparte una expresión intensa y difusa en más de un 60% de las células;
- b) “patrón salvaje”: son casos intermedios de positividad de entre el 10 y el 60%;
- c) “patrón nulo”: hace referencia a la ausencia completa de marcación siempre verificando la presencia de controles internos positivos en los linfocitos acompañantes¹⁵⁵;
- d) “no concluyente”: es una categoría de exclusión que implica posibles motivos pre-analíticos que condicionaron la calidad del material (ejemplo: fijación defectuosa).

Un ejemplo de la categorización empleada se observa en la Figura 22.

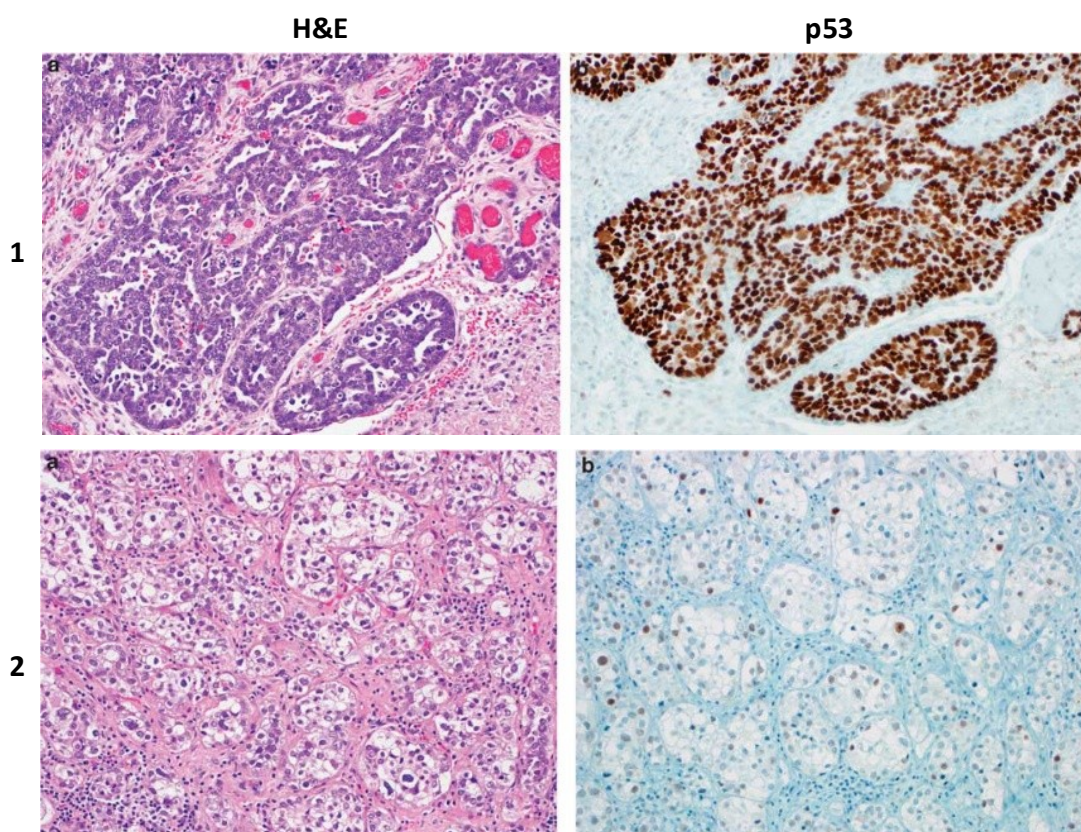


Figura 22 Inmunoreactividad para p53 y distintas categorías de expresión: (1a) un carcinoma seroso de ovario de alto grado teñido con H&E y la expresión intensa y difusa para la proteína p53 (1b) como ejemplo de patrón mutado. En (2a) se muestra un carcinoma de células claras con una marcación para p53 (2b) en escasos núcleos (~10%) concluyente como ejemplo de patrón no-mutado. Imágenes obtenidas de Yemelyanova y cols. 2012¹⁵⁴.

MARCADORES DE PROTEÍNAS DE LOCALIZACIÓN EN MEMBRANA PLASMÁTICA: TGFβRI Y RII

Se utilizó un abordaje semi-cuantitativo denominado *H-score* recomendado en ensayos clínicos modernos¹⁵⁶. El mismo consiste en:

1- determinar la intensidad de la tinción para cada célula en un aumento determinado (0, 1+, 2+, 3+) (Figura 23) y a campo fijo;

2- se multiplica la intensidad por la proporción de células que presentan dicha intensidad siguiendo la fórmula del Colegio Americano de Patólogos¹⁴⁸:

$$[0 \times (\% \text{células negativas}) + 1 \times (\% \text{células } 1+) + 2 \times (\% \text{células } 2+) + 3 \times (\% \text{de células } 3+)]$$

El puntaje final varía de 0 a 300 siendo los puntos de corte arbitrarios para la definición como positivo o negativo para el marcador utilizado. Los resultados pueden ser asignados a categorías de leve (0-100), moderada (100-200) o intenso (200-300)¹⁵⁷.

El método previamente citado es similar a estudios previos para la cuantificación de TGFβRI¹⁵⁸ y presenta ventajas porque permite obtener datos fieles a partir de marcaciones poco homogéneas⁹².

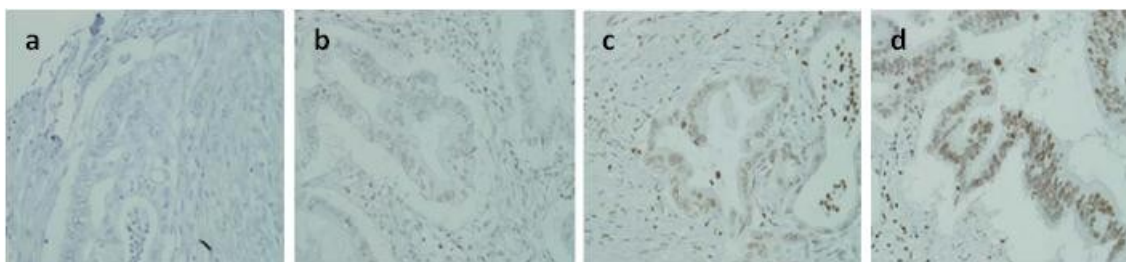


Figura 23 Ejemplos de diferentes intensidades de marcación nuclear por inmunohistoquímica para una proteína del complejo SW/SNF considerado como negativo, leve, moderado e intenso (a), (b), (c) y (d) en base al *H-score* definido anteriormente. Tomado y adaptado de Numata y cols. 2013¹⁵⁹.

MARCADORES NUCLEAR Y CITOPLASMÁTICO – TRANSLOCACIÓN DE COMPARTIMENTO CELULAR

Smad4

Se definen las categorías de este marcador en base a su distribución celular^{160,161}:

- “activo”: cuando se observa marcación a nivel nuclear acompañado o no de marcación citoplasmática;
- “inactivo”: cuando se observa marcación citoplasmática únicamente;
- “no concluyentes”: cuando el estado de la muestra o de la marcación no permite obtener resultados claros.

Se cuantificó la intensidad y el porcentaje de células que mostraran marcación nuclear utilizando el método del *H-score manual*: cada una de las células evaluadas será asignada a alguna de las categorías previamente señaladas y posteriormente se expresará como porcentaje total para cada subgrupo celular analizado: core tumoral, frente y vascular.

CRITERIO PARA LA RECLASIFICACIÓN DE LOS TUMORES EN BASE A LOS CRITERIOS DE LA OMS 2016

Si bien el diagnóstico de los tumores del sistema nervioso cuenta con un pilar fundamental histológico, actualmente se requieren estudios de biología molecular o subrogantes para su clasificación. Dado que la dificultad de implementar técnicas de biología molecular es reconocida a nivel mundial y que la OMS no se ha pronunciado en los métodos de determinación, muchos grupos y sociedades de neuropatología han realizado algoritmos diagnósticos costo-efectivos y con buena sensibilidad y especificidad de utilidad clínica validada^{30,162–164}. En base al abordaje planteado mediante el estudio de IDH1 R132H, ATRX, p53 y 1p/19q nos guiamos por un algoritmo propuesto recientemente (Figura 24)¹⁶⁵ para reclasificar los oligodendrogliomas analizados en este trabajo.

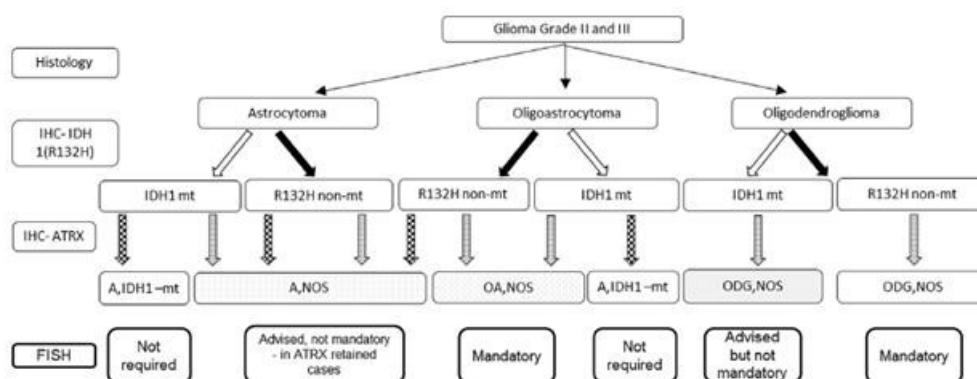


Figura 24 Algoritmo diagnóstico sugerido en la evaluación de gliomas difusos en contextos de recursos económicos limitados. El panel diagnóstico se encuentra integrado por el estudio inmunohistoquímico contra la proteína mutada de IDH1R132H y ATRX. Eventualmente se requerirá p53 (no mostrado) y FISH para determinación de la codeleción 1p719q. Tomado y adaptado de Rajeswarie y cols. 2017¹⁶⁵.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se dispusieron de doce muestras de oligodendrogliomas (6 OD y 6 OA) provenientes de pacientes de distinto sexo. De cada caso se obtuvo acceso a un número restringido de láminas lo que permitió analizar cada marcador por duplicado o por triplicado en caso de obtener resultados no concordantes. Se emplearon controles positivos y negativos normales para optimizar el protocolo de reconocimiento y el control de anticuerpos para cada marcador.

Con los datos obtenidos para cada marcador se realizó la estadística descriptiva considerándose dos poblaciones: OD y OA, evaluándose los distintos índices semi-cuantitativos en el núcleo (core) y en el frente tumoral. Se evaluó también la expresión a nivel del endotelio. El programa empleado fue GraphPadPrism6.0.

Dado el pequeño tamaño de las muestras no se pudo realizar un análisis teniendo en cuenta el sexo o el rango etario.

La comparación entre los datos de core y frente tumoral para OD y OA se realizó de la siguiente manera: se analizó la normalidad de los datos empleando Origin 8.0, se utilizó ANOVA de una cola con test de Tukey para comparación post-hoc para los datos que presentaron distribución normal y el test no paramétrico de Kruskal-Wallis para los datos que no tenían una distribución normal. Se consideró

$p < 0.05$ como nivel de significación estadística. Los datos se representaron como gráficos de cajas empleando el programa GraphPadPrism6.0

El análisis de correlación entre pares de marcadores usados se realizó empleando la herramienta correlación del programa GraphPadPrism6.0 considerando un valor promedio para cada marcador. Se determinó la curva de correlación, el valor r y R^2 de ajuste de la curva y la probabilidad de existencia de correlación, determinándose $p < 0.05$ como nivel de significación estadística. Se representaron los puntos correspondientes a cada caso, la curva determinada en línea entera y los intervalos de confianza del 95% en línea punteada.

RESULTADOS

EPIDEMIOLOGÍA DE TUMORES CEREBRALES, GLIOMAS Y OLIGODENDROGLIOMAS EN EL REGISTRO DEL HOSPITAL DE CLÍNICAS

FRECUENCIA DE CÁNCERES DEL SNC Y SU DISTRIBUCIÓN SEGÚN LOS TIPOS HISTOLÓGICOS

El análisis del registro escrito de Anatomía Patológica durante el período 01/2014 a 03/2020 permitió recabar 309 informes referentes a patologías neuroquirúrgicas de las cuales 55 corresponden a patologías no-tumorales (infecciosa, degenerativas, epilepsias) mientras que 254 eran de naturaleza tumoral de los cuales 82 fueron gliomas constituyendo el 32% de los tumores del SNC.

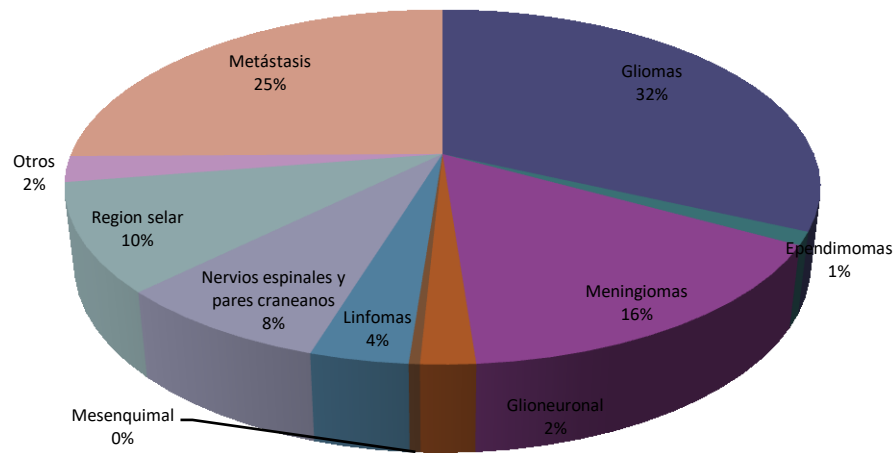
DISTRIBUCIÓN DE LOS TIPOS DE TUMORES NEUROEPITELIALES SEGÚN HISTOGÉNESIS Y GRADO HISTOLÓGICO

Dentro del grupo de los tumores neuroepiteliales, la frecuencia en orden decreciente fue la siguiente: 58% glioblastomas; 14% oligodendrogliomas; 5% oligoastrocitomas; 6% astrocitoma difuso GII; 9% astrocitoma anaplásico GIII y 2% (un único caso) astrocitoma pilocítico (Figura 25 B). Dentro de los tumores glioneuronales de bajo grado, se observaron cinco casos de gangliogliomas.

En cuanto a la topografía de los tumores gliales se observó predominio de localización a nivel frontal (37%) seguido por temporal (25%), parietal (15%), línea media (10%), cerebelo (5%), región pineal (1%) y médula espinal (1%). No se pudieron encontrar datos referidos a la localización en un 4% de los gliomas evaluados. Todos los casos de gangliogliomas se presentaron a nivel temporal, y correspondieron a cirugías vinculadas a epilepsias refractarias al tratamiento farmacológico.

La media de la edad de diagnóstico, sin discriminar por tipo de glioma fue de 50 años, siendo mayor para los glioblastomas (55,1 años) y menor para los astrocitomas difusos y anaplásicos (42,0 y 43,0 respectivamente) y los oligodendrogliomas difuso y anaplásico (36 y 48 años respectivamente). Con la información disponible, no se observó una tendencia clara respecto de posibles diferencias por sexo para ninguno de los tipos de gliomas.

A



B

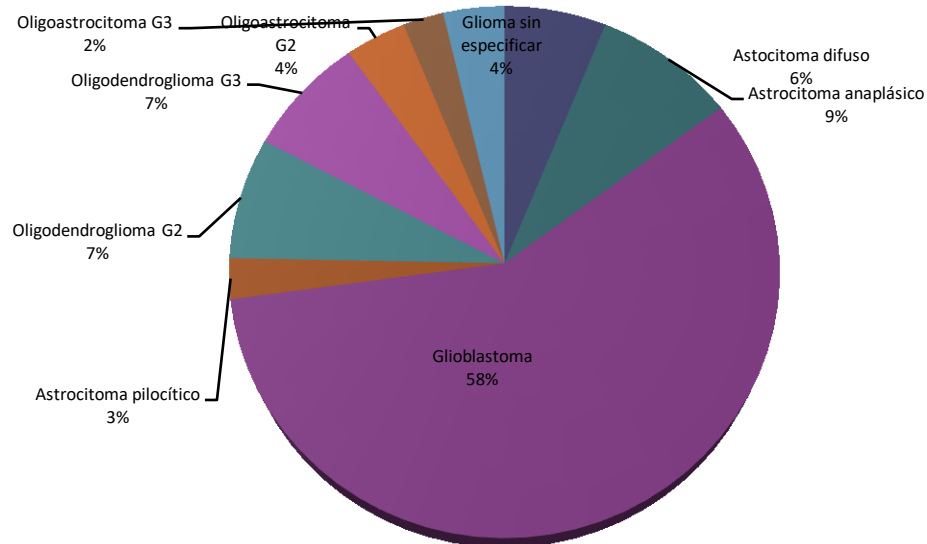


Figura 25 (A) Frecuencia de tumores del SNC según grupo histológico: evidenciando que los gliomas son los tumores de mayor frecuencia, seguidos de las metástasis y los meningiomas. (B) Frecuencia de gliomas: mostrando que el tipo más frecuente es el glioblastoma, siendo los demás menores al 15%.

La distribución de los tumores cerebrales según los grupos histológicos se muestra en la Figura 25 A y es la siguiente: 32% gliomas; 25% metástasis; 16% meningiomas; 10% tumores de la región selar; 8% tumores de los nervios espinales y pares craneanos, 4% linfomas, 2% glioneurales, 1% ependimomas y 2% otros subtipos.

CARACTERÍSTICAS DE LOS CASOS SELECCIONADOS PARA ANÁLISIS

El resumen de los datos clínicos de los 12 casos de oligodendrogliomas seleccionados para estudio se muestra en la Tabla 4, mientras que en la Tabla 5 se muestran las características promedio del grupo, las que están en concordancia con los datos referidos en el apartado anterior.

Tabla 4 Datos epidemiológicos de los casos seleccionados

<i>Caso</i>	<i>Clínica</i>			<i>Diagnóstico x 2007</i>
	<i>Sexo</i>	<i>Edad</i>	<i>Localización</i>	
1	Hombre	42	Frontal	OD
2	Mujer	37	Frontal	OD
3	Mujer	35	Frontal	OD
4	Mujer	28	Temporal	OD
5	Hombre	42	Frontal	OD
6	Mujer	37	Temporal	OD
7	Mujer	54	Frontal	OA
8	Mujer	56	Frontal	OA
9	Mujer	36	Parietal	OA
10	Hombre	37	Temporal	OA
11	Hombre	40	Frontal	OA
12	Hombre	66	Frontal	OA

Sólo se indican los datos relevantes para el estudio en forma totalmente anónima

Tabla 5 Estadística descriptiva de los casos en estudio.

	<i>Sexo</i>		<i>Edad</i>	<i>Rango</i>	<i>Localización</i>		
	<i>H</i>	<i>M</i>	<i>Promedio</i>	<i>etario</i>	<i>F</i>	<i>T</i>	<i>P</i>
OD	2	4	36.83	28-42	4	2	0
OA	3	3	48.17	36-66	4	1	1

Pese a lo pequeño de la muestra, se observa que la misma preserva algunas de las variables observadas al analizar todos los gliomas: no hay un claro predominio de sexos y la edad de diagnóstico y la localización guardan patrones similares a los que muestra el grupo total de gliomas. Dado este tamaño pequeño, no se realizaron comparaciones entre sexos, sino que se analizaron los OD por un lado y los OA por otro.

CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DE LOS OLIGODENDROGLIOMAS SELECCIONADOS

Una vez obtenido el permiso del comité de ética del hospital se analizaron las láminas de H&E que estaban disponibles y se realizaron las tinciones para los que carecían de ellas.

El análisis morfológico de las muestras teñidas con H&E permitió apreciar en todos los casos una proliferación celular oligodendroglial atípica y una celularidad elevada variable, siendo estas características más acentuadas en oligodendrogliomas anaplásicos que en difusos (Figura 26). La aparición de células con núcleo prominente, redondo y central, rodeado de un citoplasma claro y la membrana bien marcada es evidente y definitoria de la estirpe de estos tumores. Estas imágenes “en huevo frito” son más frecuentes en el OA donde aparecen adosadas conformando una imagen en “panal de abeja” típica. En todos los casos también se observó un patrón vascular de tipo endocrinoide (“en alambre de gallinero”)²⁸, además de mitosis frecuentes en los OA.

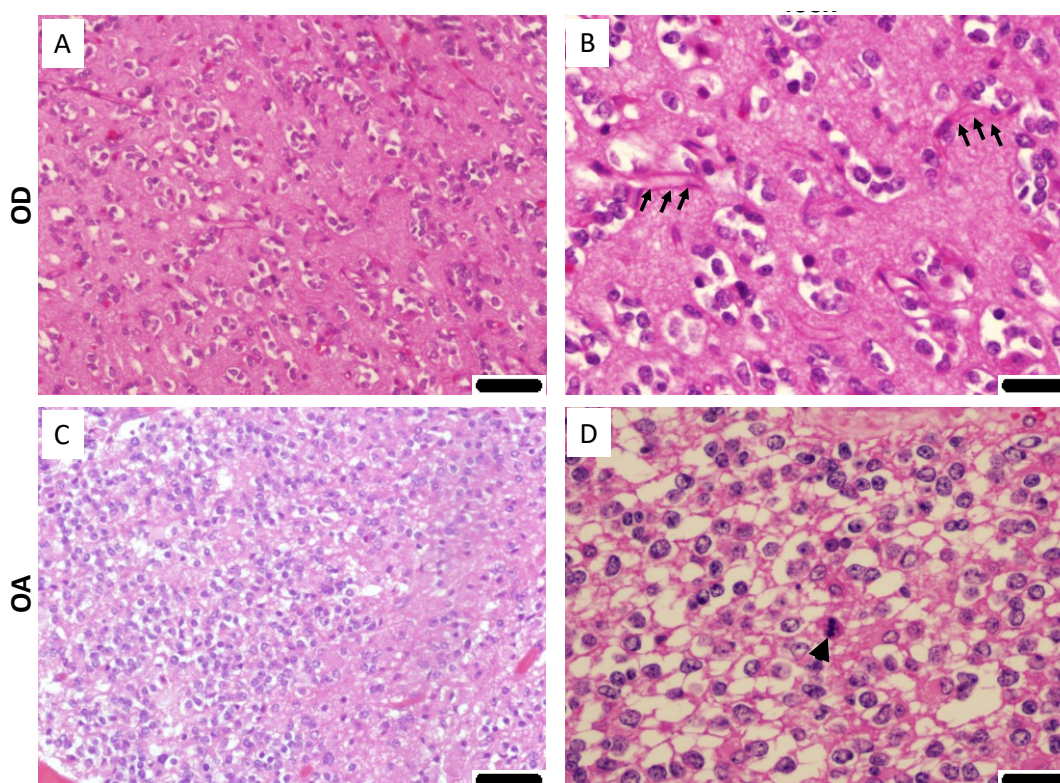


Figura 26 Características morfológicas de los oligodendrogliomas analizados. Imágenes representativas de tinciones de H&E de oligodendrogliomas difusos (OD) y anaplásicos (OA). A y C- Imágenes a bajo aumento que muestran una alta celularidad siendo mayor en los OA y un patrón de tinción característico de estos tumores. B y D-Imágenes a mayor aumento que muestran células con morfología oligodendroglial evidente, reconocibles por su citoplasma claro (“en huevo frito”) acompañado de vasos capilares sin atipias y endotelio simple (flechas negras) en el OD. En la imagen de OA hay mayor cantidad de células en huevo frito, observándose mitosis frecuentes (cabeza de flecha). Escalas: 50 μ m (A, C) y 25 μ m (B, D).

PRESENCIA CONFIRMADA DE LA CODELECCIÓN 1p/19q EN TODOS LOS OLIGODENDROGLIOMAS ANALIZADOS

Se realizó la técnica de FISH en láminas de todos los casos en estudio y se obtuvieron resultados satisfactorios para la evaluación de la codelección en 9 de los 9 casos estudiados (100%) (Figura 27).

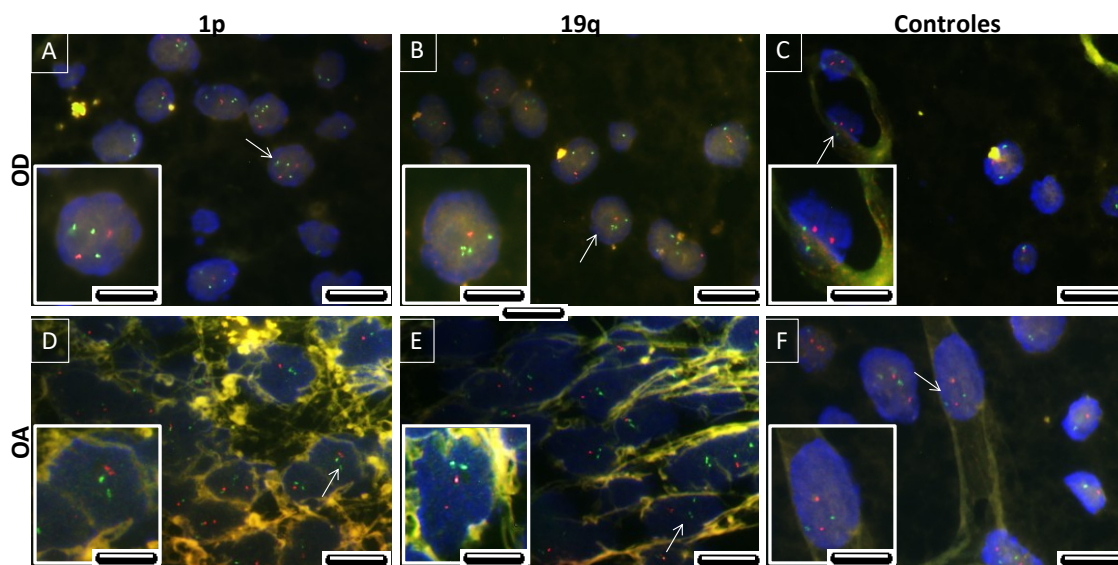


Figura 27 Evaluación de codelección 1p/19q en oligodendrogliomas. A, B, D, E - Imágenes de epifluorescencia representativas de la presencia de codelección evidenciada por una relaciones entre señales verdes (G) y de señales rojas (R) en cada núcleo alterada. Patrones de delección simple (2G1R) (Flecha blanca e insertos en B, D, y E) y patrón de delección relativa (3G2R) (flechas blancas e inserto en A). C y F- Se reconocen núcleos de células endoteliales, evidentes por su relación con la pared del capilar con fluorescencia inespecífica que muestran la relación 2G2R correspondiente a un patrón normal. Escala: 15 µm; insertos: 7µm.

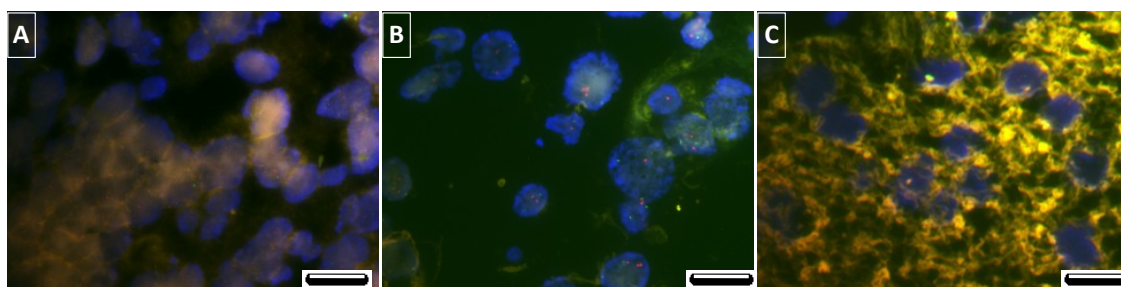


Figura 28 Áreas representativas de las muestras que no pudieron ser evaluadas mediante FISH. A- Ausencia casi completa de señales en el material evaluado. B- Presencia detectable y satisfactoria de ambas señales pero escasez de material imposibilitando llegar a un número suficiente de células evaluables (100). C- Persistencia de fondo sin digerir pese a aumento del tiempo de tratamiento enzimático. Se observa retracción nuclear típica de exceso de digestión. Barra de escala: 15 µm.

Los tres casos donde no se pudieron obtener resultados concluyentes (Figura 28) se debieron fundamentalmente a problemas técnicos asociados a la ausencia de marcación, escasez de material biológico o persistencia de autofluorescencia asociada a remanentes de tejido que no pudieron subsanarse con el limitado número de láminas disponibles.

PRESENCIA DE LA MUTACIÓN IDH1 R132H EN TODOS LOS CASOS ANALIZADOS

La mutación de la enzima IDH es un paso temprano durante la gliomagénesis y se ha reportado que ocurre en los astrocitomas GII y GIII y en los oligodendrogliomas y los glioblastomas secundarios⁶⁵. Se han desarrollado anticuerpos específicos que se unen específicamente a la proteína mutada IDH pero no a la proteína salvaje, en particular a la mutación R132H, que es la predominante y que se acepta como marcador pronóstico de gliomas infiltrantes. Esta marcación fue positiva para todos los casos de oligodendrogliomas analizados y la Figura 29 muestra imágenes representativas de los datos obtenidos.

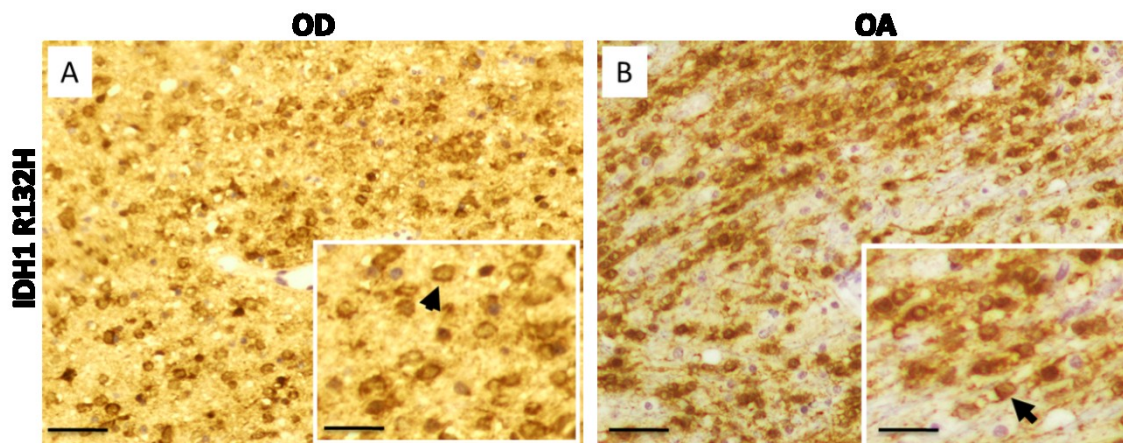


Figura 29 Inmunoreactividad positiva para IDH1 R132H en oligodendrogliomas. A y B- Imágenes representativas de la señal de IDH1 R132H en oligodendrogliomas difusos (OD) y anaplásicos (OA). En ambos casos, la señal es mayoritariamente citoplasmática aunque un porcentaje significativo de células también presentan marcación nuclear. En cada inserto, a mayor aumento, se observa claramente la marca citoplasmática (flechas negras). Escalas: 50 µm (A, B) y 25 µm (insertos).

EXPRESIÓN DE ATRX EVALUADA EN 8/8 CASOS ANALIZADOS

Mutaciones en la proteína ATRX conllevan a su pérdida de expresión, lo cual se observa en oligodendrogliomas y es un elemento extremadamente útil para diferenciar oligodendrogliomas (presencia de ATRX) de astrocitomas IDH mutados (ausencia de ATRX)¹⁶⁶. En primer lugar, la implementación del reconocimiento inmunohistoquímico de esta proteína resultó dificultosa debido a la heterogeneidad de la marca y la debilidad de la misma en los controles positivos internos.

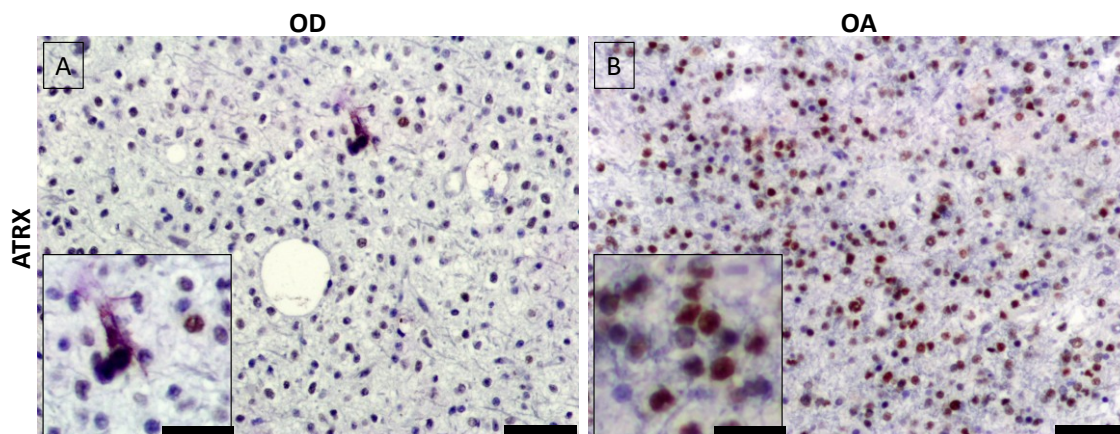


Figura 30 Inmunoreactividad para ATRX en OD y OA. En A se muestran células tumorales con núcleos positivos para la marca de intensidad variable, con conservación de la marcación también en células endoteliales. En B se observa una mayor densidad celular por tratarse de un OA, con conservación de la expresión de ATRX nuclear, de intensidad heterogénea. Los insertos a mayor aumento muestran las marcas obtenidas. Escalas: 50 µm (A, B) y 20 µm (insertos).

De todos modos, 8 de los doce casos (67%) resultaron satisfactorios para su evaluación y en todos ellos se observó conservación de la marcación. En cuatro de ellos (33%) los resultados no fueron concluyentes.

EXPRESIÓN DE p53 NO MUTADA EN TODOS LOS CASOS ANALIZADOS

Todos los tumores OA y OD mostraron marcación de tipo no-mutado para p53 dado por la positividad nuclear de leve a moderada en algunos núcleos (Figura 31) sin observarse en ninguno de los casos ausencia absoluta de marcación (patrón nulo) o expresión intensa, difusa y nuclear (patrón mutado clásico).

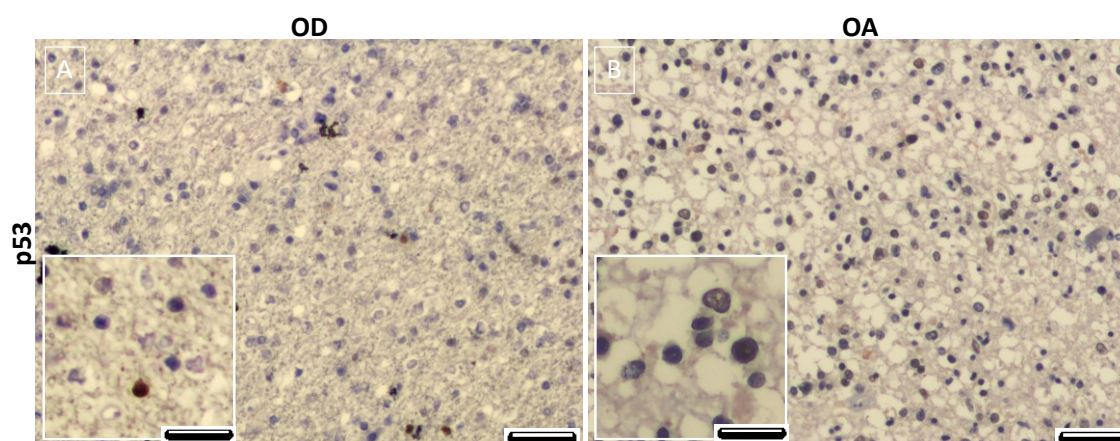


Figura 31 Inmunoreactividad para p53 en oligodendrogliomas. Fotografías representativas de la señal de p53 en OD (A) y OA (B) mostrando marcación de intensidad variable, predominantemente leve a moderada en más del 20% de las células tumorales compatibles con patrón no-mutado para p53. Escalas: 50 µm (A, B) y 20 µm (insertos).

CONFIRMACIÓN Y RECLASIFICACIÓN DE LOS OLIGODENDROGLIOMAS ESTUDIADOS

Con la integración de los resultados de H&E, FISH e inmunofenotipado se procedió a recategorizar los casos analizados (Tabla 6).

Tabla 6 Recategorización de los casos seleccionados para estudio en base a los criterios definidos por la OMS 2016

Caso	Dx OMS 2007	Codelección 1p/19q	ATRX	IDH1 R132H	p53	Dx OMS 2016
1	OD	+	NC	+	WT	OD 2016
2	OD	+	NC	+	WT	OD 2016
3	OD	+	+	+	WT	OD 2016
4	OD	+	NC	+	WT	OD 2016
5	OD	NC	+	+	WT	NOS
6	OD	NC	+	+	WT	NOS
7	OA	+	+	+	WT	OA 2016
8	OA	+	+	+	WT	OA 2016
9	OA	+	+	+	WT	OA 2016
10	OA	+	+	+	WT	OA 2016
11	OA	+	+	+	WT	OA 2016
12	OA	NC	NC	+	WT	NOS

Dx: diagnóstico; (+) indica expresión positiva; NC: no concluyente; WT: wild type. En verde y rojo se muestran los casos en donde se logró aplicar el nivel de diagnóstico integral de la OMS 2016 para OD y OA respectivamente. Los casos que no pudieron contar con certificación del perfil molecular permanecieron en la categoría NOS (del inglés: Not Otherwise Specified)

Con esta integración, dando prioridad al resultado de 1p/19q, cuatro de los seis casos categorizados como OD (67%) y 5 de los 6 clasificados como OA en 2007 (83%) fueron reconfirmados como tales según los criterios vigentes desde 2016. Es de destacar que no hubo casos contradictorios entre los hallazgos histológicos y de subrogantes moleculares. Un único caso no pudo contar con estudios concluyentes para ATRX y FISH (Tabla 6).

EVALUACIÓN DE LA VIA DE TGF β EN LOS CASOS ANALIZADOS

PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA PARA TGF β RI, RII Y Smad4

Se obtuvo marcación satisfactoria para TGF β RI y RII mediante recuperación alcalina (TRIS-EDTA 1mM, pH 9.0). La localización de la señal fue la esperada tanto a nivel tisular como celular y la relación de su intensidad con la inespecífica de fondo (ej: colágeno, fibroblastos) fue muy aceptable (Figura 32).

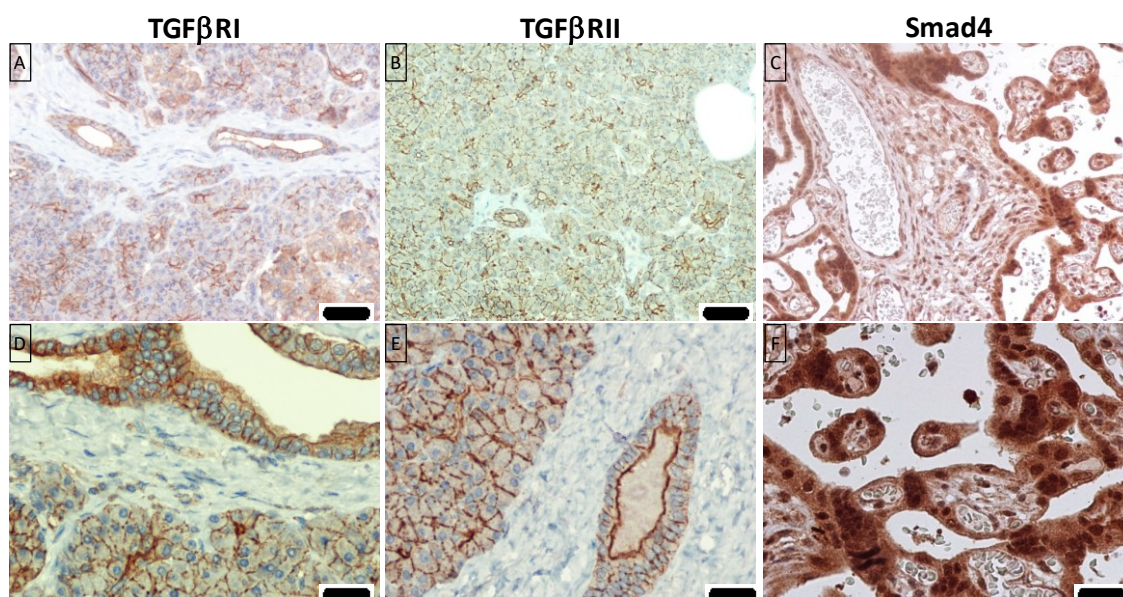


Figura 32 Optimización de protocolos para la detección de TGF β RI (A, D); TGF β RII (B, E) y Smad4 (C, F). Para TGF β RI y RII, el análisis en tejido pancreático normal humano mostró señal positiva en las membranas de los componentes ductales y acinares. C, F- El anticuerpo derivado de la clona SBS-63 marcó intensamente los núcleos de las células trofoblásticas placentarias mientras que la intensidad de la marca citoplasmática fue menor. Escalas: 50 μ m (A-C) y 25 μ m (D, E).

FALLA EN LA INMUNODETECCIÓN DE Smad2 USANDO LAS CLONAS 1B10 Y 1C12

Respecto de Smad2, no se observó marcación satisfactoria utilizando las clonas 1B10 y 1C12 en la concentración recomendada por el fabricante (1:25 y 1:50, respectivamente) utilizando diferentes métodos de recuperación (ácida y básica) y diferentes tiempos de incubación (Figura 33). Cabe acotar que se emplearon distintos controles positivos normales tal como se indica en la figura mencionada. Además, dada la marcación citoplasmática a nivel del citotrofoblasto placentario reportada usando las concentraciones recomendadas, se intentó utilizar el anticuerpo primario sin diluir obteniéndose resultados similares a los anteriores (Figura 34).

SMAD2

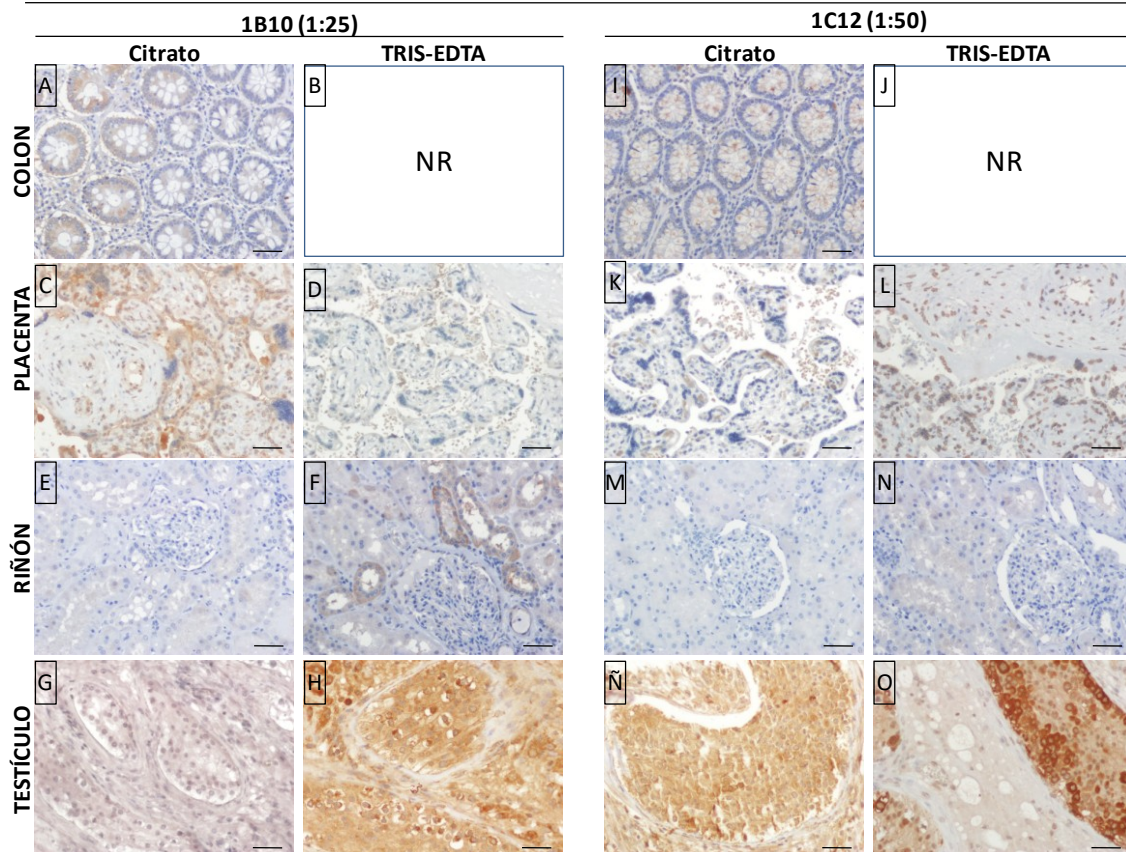


Figura 33 Puesta a punto para el reconocimiento de Smad2. Se evaluaron las clonas 1B10 y 1C12 en colon, placenta, riñón y testículo frente a distintas condiciones de reclutamiento ácido (citrato) y básico (TRIS-EDTA). Las señales obtenidas en colon (A, I) y en riñón (E, F, M, N) son ejemplos claros de marca negativa e inespecífica. A nivel de la placenta (C, D, K, L) se apreció marcación citoplasmática de los endotelios pero ausencia completa de expresión nuclear en el citotrofoblasto y células deciduales, mientras que los resultados obtenidos en testículo (G, H, Ñ, O) son ejemplos de marcación inespecífica/no apta dado por ausencia de marcación nuclear en presencia de marcación citoplasmática. Barra escala: 50 μ m. NR: no realizado.

TRIS-EDTA

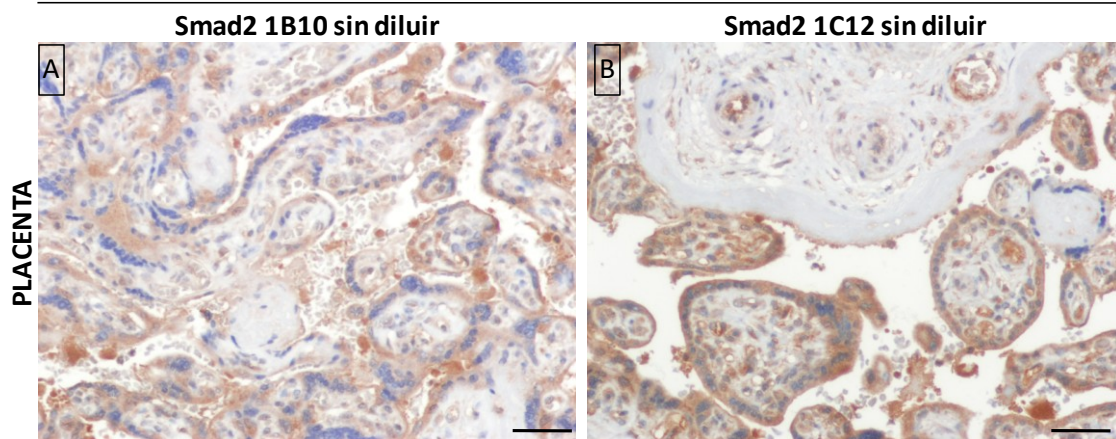


Figura 34 Marcación para Smad2 en placenta recuperada con TRIS-EDTA empleando los anticuerpos específicos anti-Smad2 B10 (A) y 1C12 (B) sin diluir. En ambos casos se observa la persistencia de la marca citoplasmática inespecífica en ausencia de marcación nuclear en el citotrofoblasto o en células deciduales. Barra escala: 50 μ m.

FALLA EN LA INMUNODETECCIÓN DE Smad4 USANDO LAS CLONAS 1G11 Y 1D12

Debido a los resultados fallidos obtenidos en los controles positivos normales empleando los anticuerpos anti-Smad4 (Figura 36, Figura 35) y anti-Smad2 (Figura 33, Figura 34) del Hybridoma Bank, estos anticuerpos no fueron probados en las muestras tumorales. Por lo tanto, no se pudo ensayar la marca para Smad2 en los distintos oligodendrogliomas y Smad4 se detectó utilizando otro anticuerpo (BSB-63 de Bio SB, 1:100) que evidenció una marcación satisfactoria dado por la presencia de positividad nuclear y citoplasmática en tejido placentario recuperado con TRIS-EDTA (Figura 32, C-F).

SMAD4 – ID12

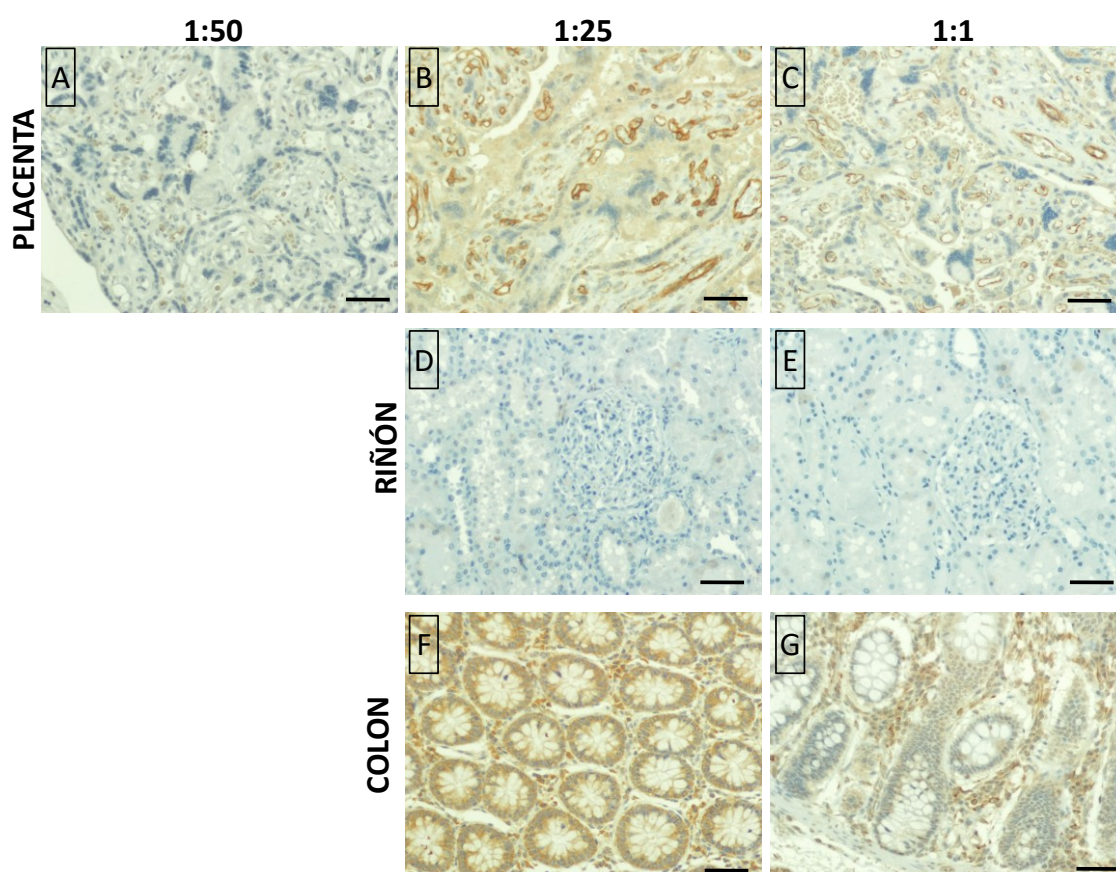


Figura 35 Ausencia de marca específica para Smad4 en controles positivos empleando otro anticuerpo. Se realizó recuperación antigénica con TRIS-EDTA e incubó con distintas concentraciones. Barra escala: 50 μ m.

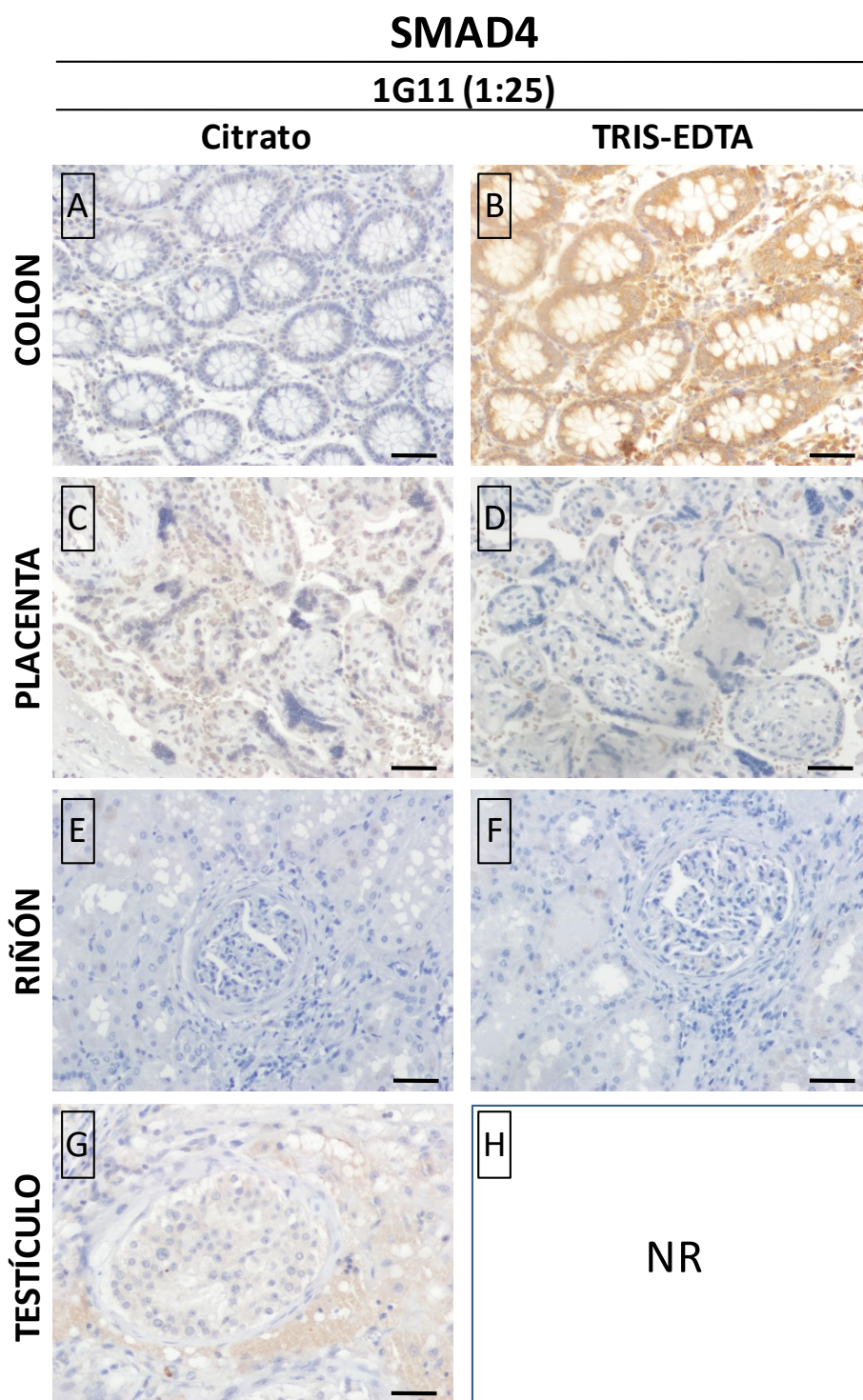


Figura 36 Ausencia de marcación nuclear para Smad4 luego de incubar muestras normales de colon, placenta, riñón y testículo con el anticuerpo 1G11 a las concentraciones recomendadas por el fabricante y con dos protocolos de recuperación antigénica distintos (A, C, E, F: citrato pH 6; B, D, F: TRIS-EDTA pH 9. Barra escala: 50 μ m. NR: no realizado.

EXPRESIÓN DEL RECEPTOR TGF β RI EN LOS OLIGODENDROGLIOMAS ANALIZADOS

Se observó marcación satisfactoria para TGF β RI evidenciada por positividad a nivel de membrana en ausencia de marcación nuclear en los oligodendrogliomas difusos y los anaplásicos (Figura 37, A-D e insertos). Se observa marcación a nivel de las membranas en el núcleo (*core*) y en el frente tumoral. En algunos casos también se observó una marcación citoplasmática, a veces granular, (Figura 37, C inserto).

El conteo de células positivas y la intensidad de la señal permitió determinar el *H-score* para TGF β RI en el *core* tumoral y en el frente de infiltración. Los valores para OD fueron 120.1 ± 38.6 y 115.1 ± 44.0 , para el *core* y el frente respectivamente. Mientras que para los OA, se encontraron valores de 225.8 ± 57.7 y 237.5 ± 60.2 para el *core* y el componente infiltrante respectivamente. Comparando estos valores, se ha encontrado que la diferencia visual notoria observada entre ambos tiene significación estadística para $p < 0.01$ (Figura 37, E y F).

La expresión a nivel endotelial en las porciones intratumorales de los OD y de su frente de invasión fue de 101.7 ± 4.1 y 95.0 ± 18.7 , similar a lo observado, en OA con valores de 103.3 ± 24.8 y 95.8 ± 14.3 , respectivamente. No se observaron diferencias significativas tanto para las diferentes topografías como para los grados tumorales (Figura 37, E y F).

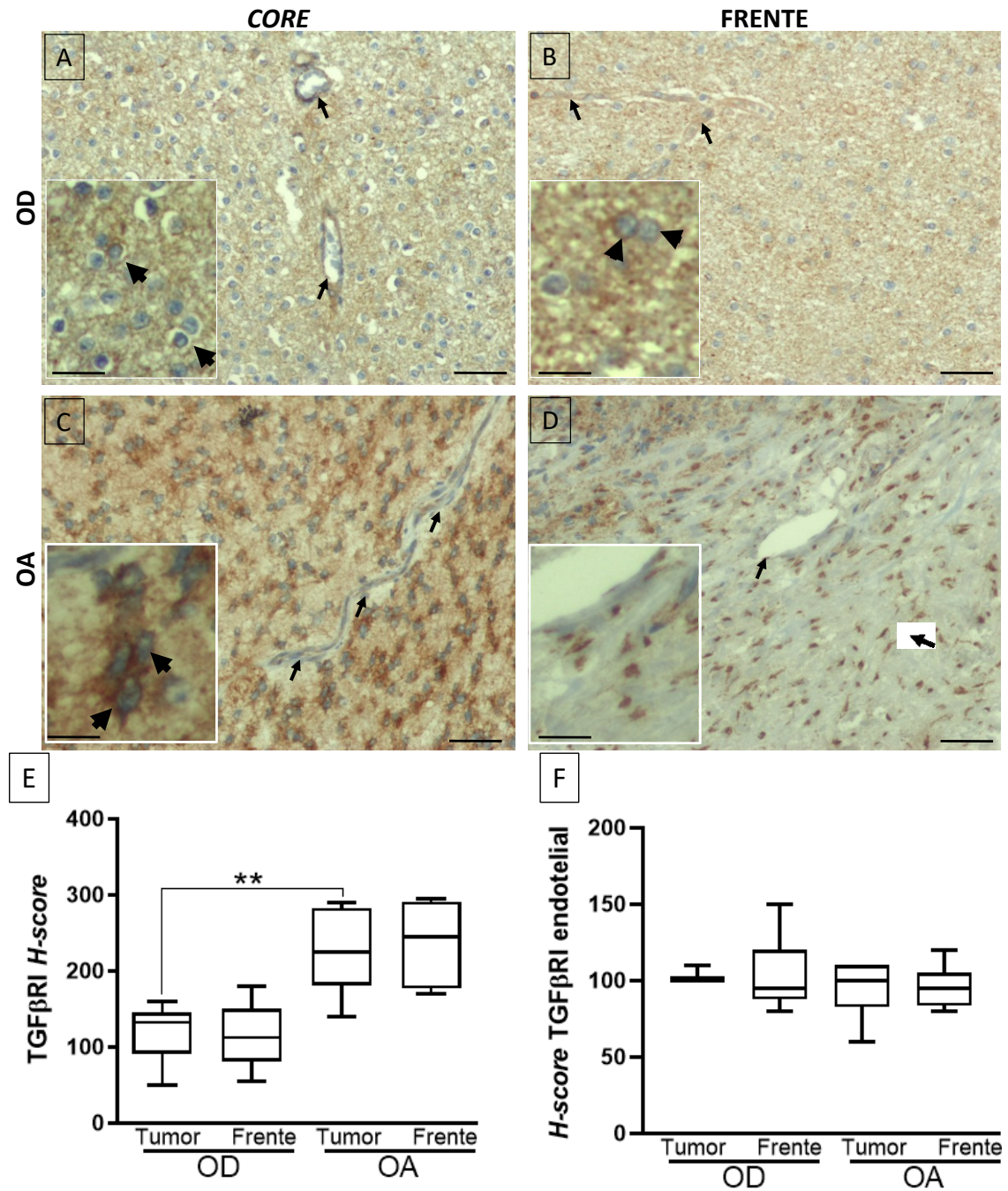


Figura 37 Inmunoreactividad para TGFβRI en oligodendrogliomas difusos (A, B) y anaplásicos (C, D). Se evidencia expresión leve en los OD en la población tumoral mientras que resulta moderada a marcada en OA. La marcación en el componente vascular (flechas) fue leve y sin evidencia de expresión diferencial entre los diferentes grados tumorales o entre el *core* o el frente de cada tumor. Escala: 50μm en imágenes, 20 μm en insertos. E, F- Gráficas comparativa de los índices de expresión de TGFβRI en el tumor (E) y en el endotelio (F) en sus regiones intratumorales (o *core*) y en los sectores de infiltración distales (frente). Se observó aumento significativo en los OA respecto de los OD, $p < 0.01$. Se evaluaron 3 cortes para cada caso en 3 tinciones independientes.

EXPRESIÓN DEL RECEPTOR TGF β RII EN LOS OLIGODENDROGLIOMAS ANALIZADOS

Los casos evaluados de TGF β RII resultaron satisfactorios en todos los preparados analizados aunque en circunstancias la calidad y procesamiento del material determinó artefactos como espacios ópticamente vacíos (Figura 38, B). Las células tumorales resultaron con marcación de membrana y citoplasmática, discretamente heterogénea granular tanto en el componente core como en el frente, aunque la marcación a nivel de la membrana fue menos definida que la observada para TGF β RI (Figura 38, insertos). Particularmente en el core tumoral, parece observarse aumento de la marcación asociada al aumento del grado histológico, pero menos evidente que el observado en TGF β RI. La expresión de TGF β RII en el componente endotelial es débil en todas las topografías y componentes (Figura 38 F).

La evaluación semicuantitativa de la expresión de TGF β RII mostró que los *H-scores* determinados para el conjunto de ODs fue 94.2 ± 34.4 y 58.3 ± 20.7 para el core y el frente tumoral, respectivamente. Para los OAs, los valores fueron 191.7 ± 57.0 y 170.8 ± 93.0 confirmando el aumento moderado de la señal en OAs respecto de ODs observado en las imágenes. El mismo análisis realizado en los endotelios determinó que los valores de *H-scores* fueran: 90.0 ± 11.0 y 83.3 ± 12.1 para el endotelio del core y del frente tumoral en ODs respectivamente. La expresión de TGF β RII en los OAs, tuvo valores que fueron 91.7 ± 8.2 y 86.7 ± 6.1 , que confirman que la señal se mantiene sin cambios comparando ambos niveles de oligodendrogliomas.

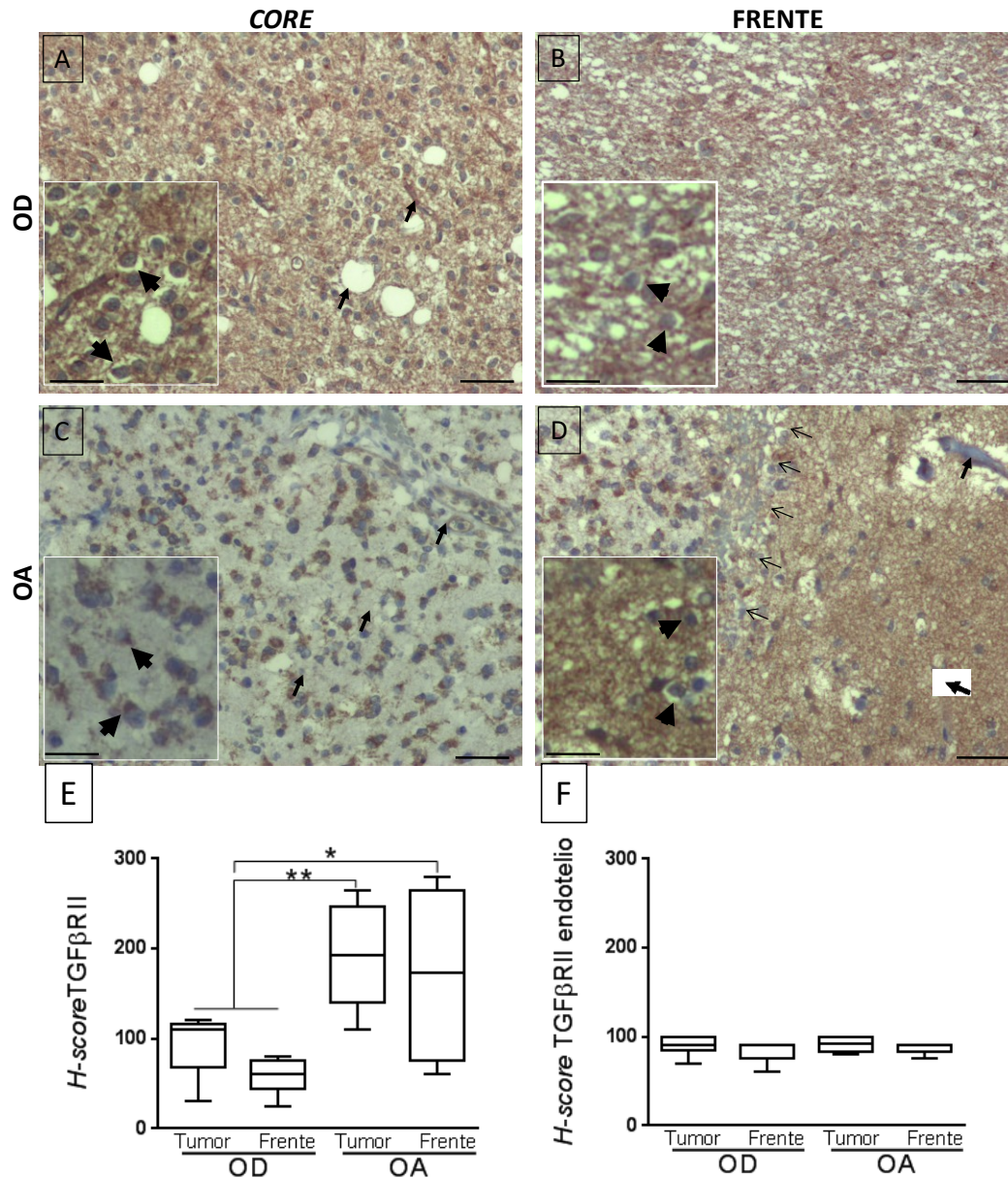


Figura 38 Inmunoreactividad para TGFβRII en oligodendrogliomas difusos y anaplásicos. Se evidencia expresión leve en las células (flechas en insertos) de los OD tanto en dentro (A) como en el frente tumoral (B). La marca resulta más específica en OA (C, D) y es citoplasmática y en membrana (flechas en insertos de C y D). La marcación en el componente vascular (flechas finas) tanto a nivel intratumoral como en los sectores de infiltración fue leve. Las flechas pequeñas en D muestran la zona de transición entre el tumor y su frente. Escalas: 50 μm y 20 μm en insertos. E, F- Gráficas que muestran los índices de expresión de TGFβRII en la población tumoral (E) y endotelio (F), evidenciando el aumento de expresión en OAs respecto de ODs pero con mucho mayor dispersión entre los casos. **: p<0.01 comparando entre núcleos tumorales de OD y OA. *: p<0.05 entre los frentes de ambos niveles.

EXPRESIÓN DE Smad4 EN LOS OLIGODENDROGLIOMAS ANALIZADOS

La marca para Smad4 en los oligodendrogliomas analizados empleando el anticuerpo fabricado por SB Bio fue observada a nivel nuclear en intensidades variables, catalogándose los resultados como satisfactorios (Figura 39). Las células endoteliales también mostraron marcación leve siendo mayor en los OA que en los OD (Figura 39 C, flechas). En algunos casos, varias células también mostraron marca citoplasmática pero difícil de evaluar por el artefacto de retracción.

El cálculo de los H-Score para el Smad4 en el componente tumoral de OD (50.8 ± 33.5) fue inferior al de OA (130.0 ± 80.0), mientras que los frentes de avance tumoral mostraron valores similares: 48.3 ± 32.4 para OD y 111.7 ± 67.6 para OA. En cuanto a la expresión en células endoteliales, los valores fueron 86.7 ± 13.7 y 90.0 ± 15.8 para OD en el core y frente respectivamente. En los OA, la expresión en los endotelios en el núcleo tumoral fue 72.5 ± 16.4 , mientras que en los endotelios del frente tumoral de los OA fue 76.7 ± 18.6 , indicando una inmunoreactividad sin variaciones significativas en todas las regiones analizadas.

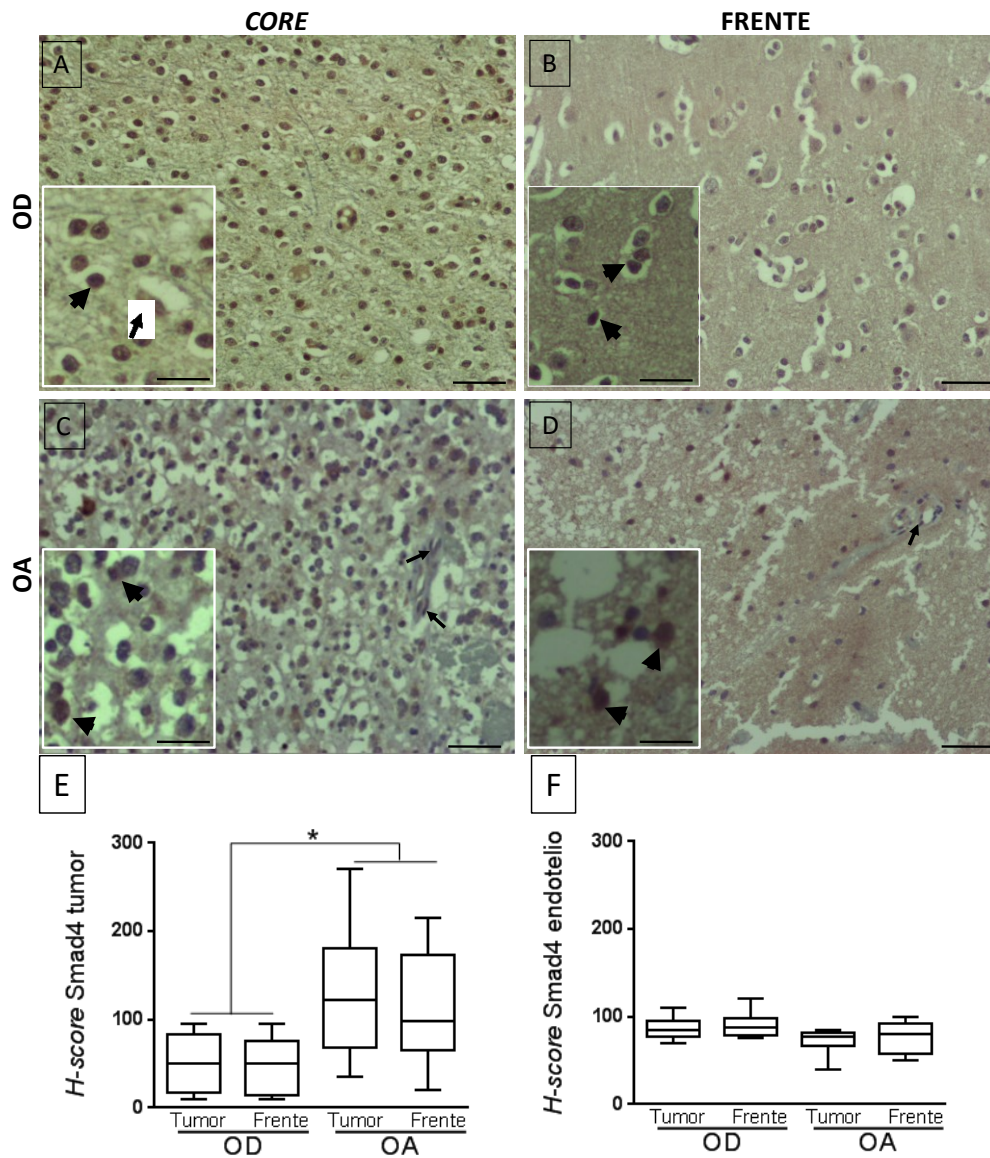


Figura 39 Expresión de Smad4 en OA y OD en su sector tumoral e infiltrativo distal. Se observa marcación débil nuclear en el componente celular tumoral de los OD (A) y discretamente mayor en los OA (C). También se observó marca similar en los frentes de ambos niveles de oligodendrogliomas (B, D). Los insertos muestran núcleos marcados (flechas gruesas) y algunas células con marcación citoplasmática (inserto OD, flecha negra fina). A nivel del endotelio la marcación fue homogéneamente débil en ambas regiones de los OA y OD (Flechas finas). E-F- Gráfica de cajas mostrando los índices (H-score) para todas las condiciones. Se determinó un aumento estadísticamente significativo en el núcleo tumoral entre OA y OD ($p < 0.05$). La evaluación en el endotelio mostró valores similares en OD y OA, dentro del tumor y en el frente tumoral.

ANÁLISIS CONJUNTO DE LA EXPRESIÓN DE LOS COMPONENTES DE LA VÍA TGF β

La correlación de los índices H de TGF β RI, TGF β RII y Smad4 fue realizada empleando los valores obtenidos para cada caso y parámetro (Figura 40). Tal como se muestra en esta figura, al correlacionar los valores de los receptores de TGF β entre sí dentro del tumor (Figura 40 A) y en el frente tumoral (Figura 40 B), se obtienen dos poblaciones claramente identificadas que corresponden a ODs (verde) y a OAs (rojos), con los OAs ubicados en los valores mayores. No obstante, la dispersión de valores, no permite obtener una curva de correlación con un R^2 que se aproxime a 1. De todos modos, el valor de p obtenido indica que hay una correlación positiva entre los índices de ambos receptores en el núcleo y en el frente tumoral (Figura 40 A y B). Realizando el mismo análisis correlacional entre cada receptor y Smad4, solo se pudo determinar la existencia de una correlación positiva entre el receptor II y esta proteína en el núcleo tumoral (Figura 4 E). Los valores obtenidos de p para el análisis entre TGF β RI y Smad4 en el core y frente tumoral y para TGF β RII y Smad4 en el frente, permiten indicar que no existe correlación entre cada par y que estos resultados no cambiarían con un aumento moderado de la muestra (Figura 40 C, E).

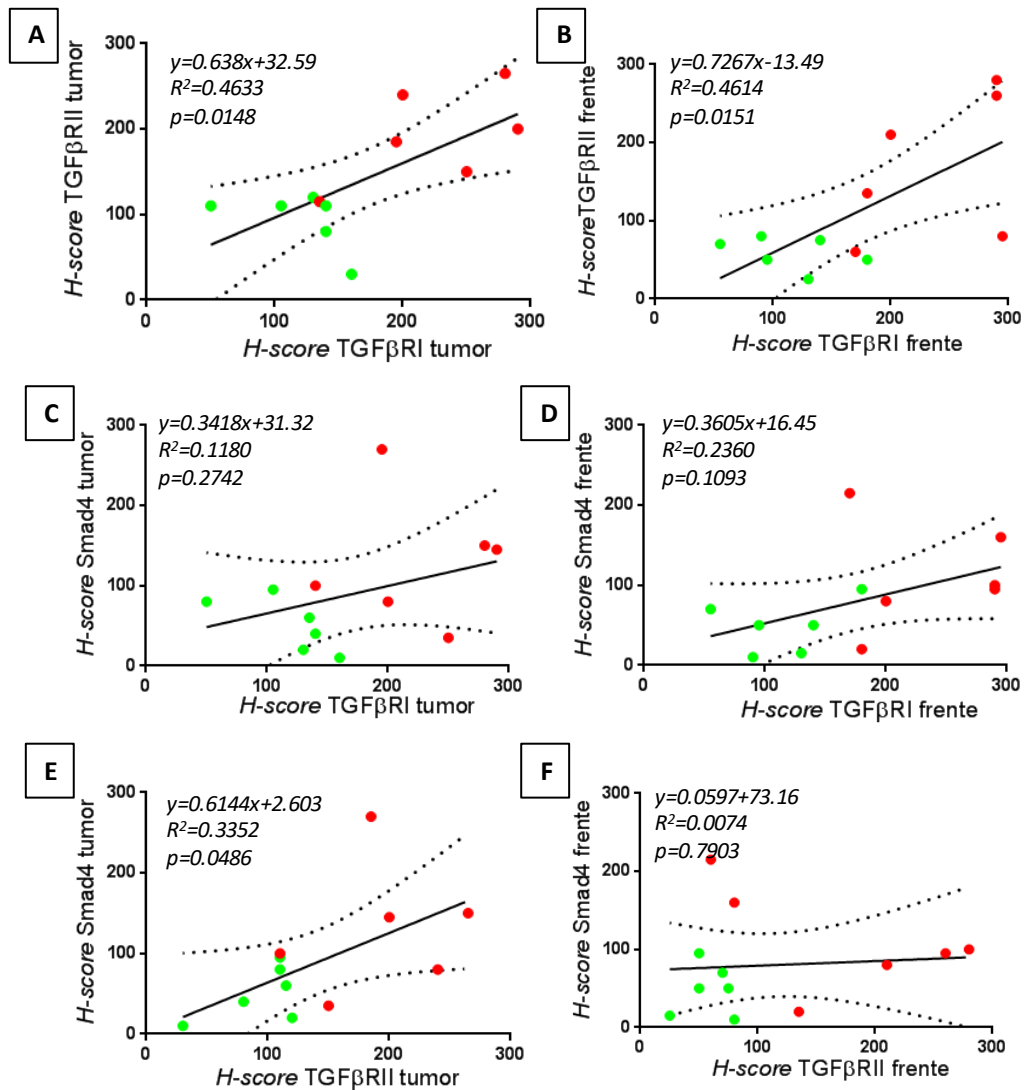


Figura 40 Correlación entre los índices de expresión de participantes de la vía de TGF β . Se correlacionaron los H-score para las tres proteínas analizadas para cada caso analizado. En verde se muestran los pares de valores para cada OD y en rojo, los pares de valores para cada OA en el tumor (A, C, E) y en el frente tumoral (B, D, F). La línea entera muestra la curva indicando la correlación entre las variables, las líneas punteadas muestran los intervalos de confianza del 95%. La ecuación muestra la curva que correlaciona las dos variables analizadas, el R^2 y el valor de probabilidad de que la pendiente sea diferente de 0 confirmando una correlación positiva como en A, C y E. En el frente tumoral solo hubo correlación positiva con una pendiente significativamente diferente de cero en B, descartándose en D y F con los datos disponibles.

ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN CELULAR EVALUADA MEDIANTE EXPRESIÓN DE Ki67

Se analizó la expresión de Ki67 mediante inmunohistoquímica para todos los casos de oligodendrogliomas analizados. La marca nuclear que se obtuvo es la esperable y presenta distintas intensidades recordando que cualquier grado de intensidad se considera como positiva (Figura 41). El cálculo del índice de proliferación graficado en la Figura 41 E, indica que los valores obtenidos para el núcleo en ODs son $2.7\% \pm 0.4$ y de $13.3\% \pm 2.3$ para los OA con diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.0001$). Este índice, en cambio, fue significativamente menor en los sectores de infiltración alejados del tumor: $0.5\% \pm 0.3$ para OD y $0.57\% \pm 0.3$ para OA, sin diferencias significativas entre ambos frentes (Figura 41 E).

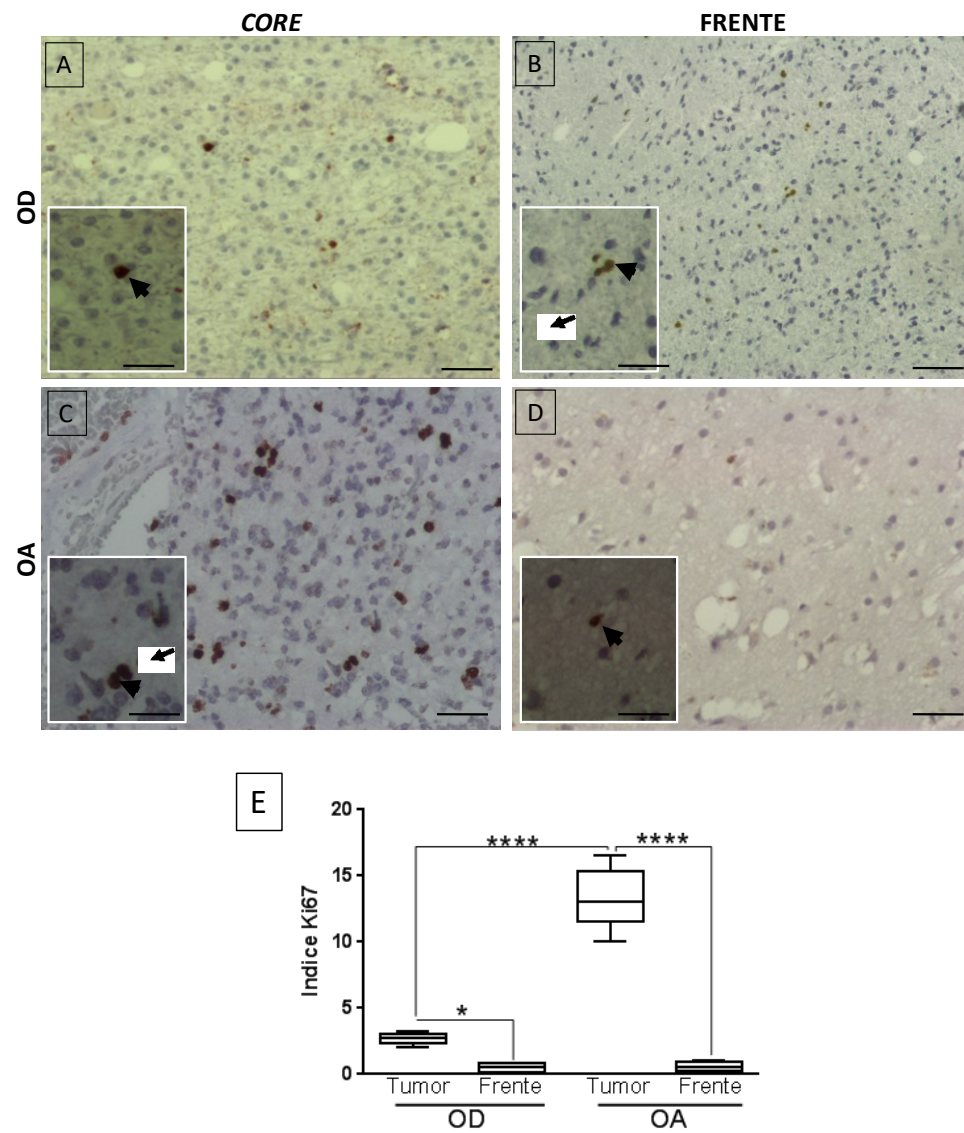


Figura 41 Expresión de Ki67 como indicador de proliferación celular en OD y OA. Se muestran núcleos positivos marrones con distinta intensidad (insertos) y mayor número en OA respecto de OD. La gráfica en E, muestra el análisis de todos los casos estudiados y evidencia la diferencia estadísticamente significativa entre los *cores* tumorales de OD y OA (E). (*: $p < 0.05$ y ****: $p < 0.0001$).

ANÁLISIS DE LA CORRELACIÓN ENTRE LA VÍA DE TGF β Y LA PROLIFERACIÓN CELULAR

El análisis de los índices H calculados para los receptores TGF β RI, TGF β RII y Smad4 con el índice Ki67 considerando cada par de valores muestra que los ODs constituyen una población claramente diferente de los OAs, sin embargo, el grado de dispersión no permite tener una curva de correlación con un buen R^2 (Figura 42). Pese a ello, el análisis estadístico asociado al análisis correlacional mostró que existe altísima probabilidad ($p=0.0021$) de una correlación positiva entre TGF β RI y la proliferación celular en el núcleo tumoral (Figura 42 A). El mismo análisis reveló alta probabilidad de correlación positiva entre TGF β RII y proliferación ($p=0.02$) en el núcleo tumoral (Figura 42 C) y una muy alta tendencia de correlación positiva entre Smad4 y proliferación celular ($p=0.07$) (Figura 42 E), sugiriendo que es necesario un n mayor para alcanzar valores de $p<0.05$. En el frente tumoral no se observó correlación entre ningunas de las variables analizadas (Figura 42 B, D, F).

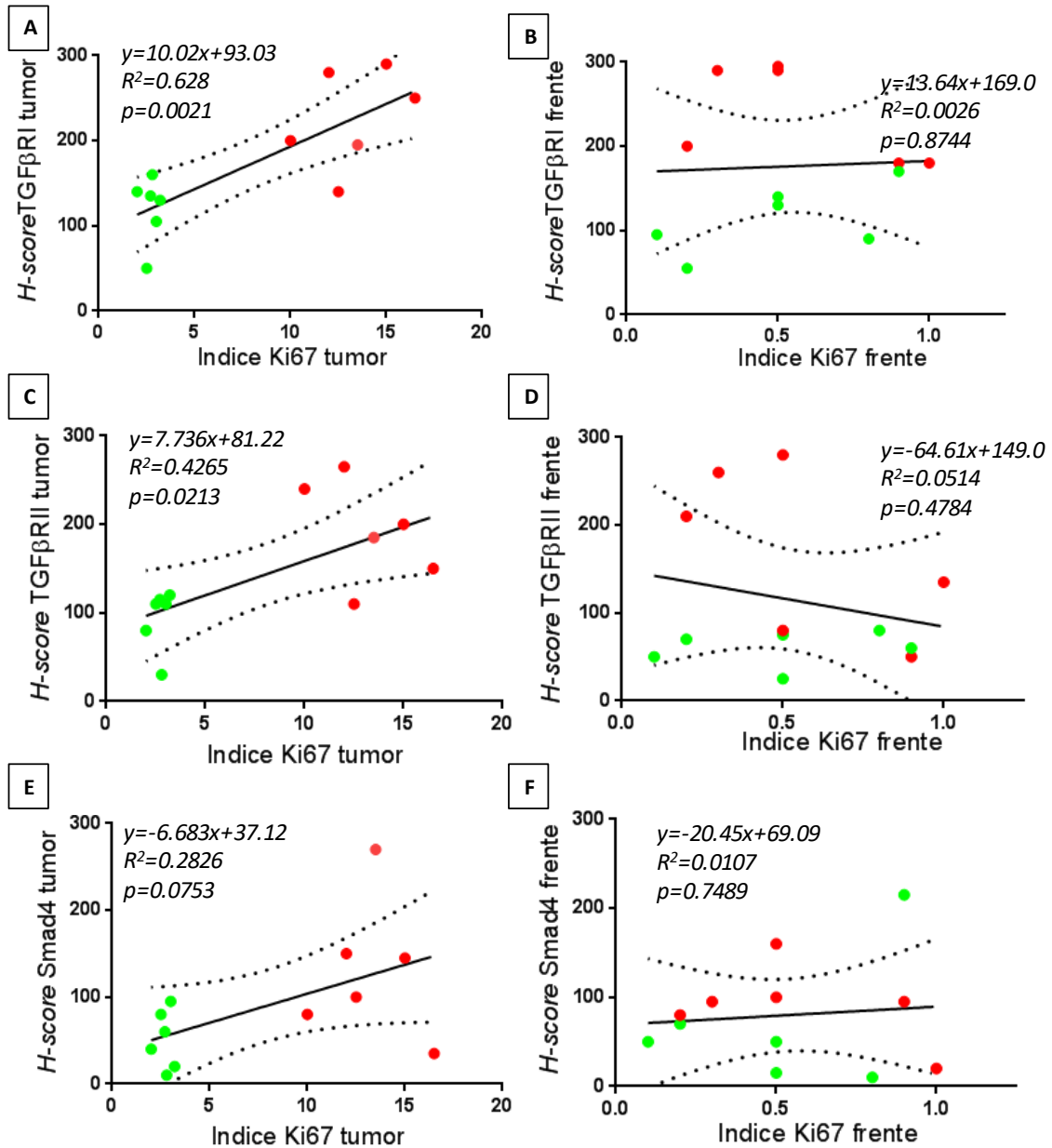


Figura 42 Correlación entre los índices de expresión de participantes en la vía de TGF β y proliferación celular. Se graficaron los H-score para las tres proteínas de la vía estudiadas en cada OD y cada OA versus los índices de Ki67 en el tumor (A, C, E) o en el frente tumoral (B, D, F). En verde están los pares de valores para cada OD y en rojo para cada OA. La línea entera muestra la curva indicando la posible correlación positiva, mientras que las líneas punteadas muestran los intervalos de confianza del 95%. La ecuación muestra la curva que correlaciona las dos variables analizadas, el R^2 y el valor de probabilidad de que la pendiente sea diferente de 0 confirmando una correlación positiva como en el caso de TGF β RI o RII vs Ki67 (A, C). Esta relación no es tan clara en Smad4 vs Ki67 ($p=0.07$) por lo que habría que aumentar el n para confirmar o descartar la existencia de correlación entre ambas variables. No se observó correlación entre ninguna variable y el frente tumoral. Nótese que los índices de Ki67 en las áreas infiltrantes son al menos 10 veces menores que en el núcleo tumoral.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En este trabajo de tesis se realizaron las siguientes actividades: (i) relevamiento de los casos de tumores del SNC y gliomas registrados en el archivo de Anatomía Patológica del Hospital de Clínicas; (ii) selección de los casos a estudiar luego de la aprobación del comité de ética del HC; (iii) aprendizaje y optimización de las técnicas de FISH e inmunohistoquímica; (iv) realización de las técnicas y análisis de los resultados obtenidos que nos permiten discutir los siguientes puntos.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO Y VALOR DE LOS DATOS EPIDEMIOLÓGICOS OBTENIDOS

Se contó con material disponible de 12 resecciones humanas que provinieron de 5 hombres y de 7 mujeres con edades entre 28 y 66 años. El número de casos, el sexo y el amplio rango etario impidió el análisis estadístico basado en el sexo o la distribución por edades, por lo que se optó por un análisis descriptivo considerando los dos niveles tumorales en su conjunto (OD vs OA). Ello permitió obtener dos conjuntos de resultados que fueron comparados entre sí, pero se considera necesario obtener una población mayor para analizar casos más homogéneos en cuanto a sexo, edad y topografía. Por ejemplo, debe aumentarse el número de muestras para realizar el análisis basado en sexo, ya que se ha descripto que hay una prevalencia mayor de hombres en gliomas y de oligodendroglioma con una relación hombre-mujer de 1.3:1²⁸. Similar argumento puede aplicarse a la edad de diagnóstico, en la cual se reconoce un pico de incidencia entre los 35-44 años²⁸.

El análisis epidemiológico realizado desde 2014 hasta 2020 mostró que en adultos, los gliomas (32%) son el grupo histológico más frecuente dentro de los tumores del SNC, de forma similar a lo reportado en la literatura^{167,168}. También hubo concordancia con los datos internacionales referentes a la localización de los gliomas¹⁶⁸ y a media de la edad de presentación o diagnóstico.

Sin embargo, pese a que la muestra que usamos es muy pequeña y no puede compararse con estudios epidemiológicos de envergadura, encontramos diferencias con la literatura en la frecuencia de los distintos tipos de gliomas. Nuestros datos muestran que los astrocitomas y oligodendrogliomas fueron el 15% y el 14% de todos los gliomas registrados en el período analizado, mientras que el Reporte del Registro de Tumores del SNC de USA (CBTRUS, del inglés *Central Brain Tumor Registry USA*) muestra que la frecuencia fue de 5.3% y 2.0%, respectivamente, para el período 2012-2016³⁸. La OMS refiere que los tumores oligodendrogliales son el 5.9% de todos los tumores primarios gliales²⁸. Sin embargo, en nuestro medio, Sgarbi y cols. (2019) describen una serie de casos de 175 pacientes estudiados por resonancia magnética y confirmación anatomopatológica donde 76 casos correspondieron a gliomas de bajo grado (43.4%) de los cuales 28 pacientes tuvieron un oligodendroglioma difuso grado II (16%)¹⁶⁹.

Además del tamaño de la muestra que analizamos, creemos que la falta de definiciones consensuadas respecto del concepto de gliomas como clase histológica¹⁷⁰, las diferencias al momento de llenar los registros, los cambios en las clasificaciones de los tumores y la falta de confirmación histológica o de revisiones por patólogos expertos, podrían explicar las variaciones entre los datos epidemiológicos¹⁷¹. Más aún, estudios posteriores a la clasificación de la OMS de 2016, llevaron a una reclasificación/recategorización de hasta un 30% de los diagnósticos previos y hasta el 16% de los diagnósticos con discordancias en pronóstico y tratamiento¹⁷². Este disenso ha llevado a proponer que solo los meningiomas y glioblastomas cuentan con criterios suficientes temporales y geográficos para omitir su revisión en cada estudio epidemiológico realizado¹⁷³. Por lo tanto, los oligodendrogliomas están sujetos a reclasificación y su incidencia podría cambiar aún en estudios con datos poblacionales grandes.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y RECLASIFICACIÓN DE LOS oligodendrogliomas ESTUDIADOS

El 100% de los casos analizados presentó características histológicas clásicas de oligodendroglioma tal como fue confirmado con la técnica de H&E y la mayoría del material disponible fue apto para procesamiento y reconocimiento a pesar de que parte del mismo fue fijado varios años atrás. El número acotado de secciones disponibles fue un elemento limitante al momento de obtener el mejor resultado luego de optimizar la técnica en controles positivos sanos.

Los resultados obtenidos mostraron excelente correlación con la clasificación histológica inicial. Los datos moleculares confirmaron 9 de los 12 casos estudiados cumpliendo todas las marcas moleculares características de oligodendrogliomas¹⁷⁴. Los 3 casos restantes presentaron las características inmunofenotípicas correspondientes pero la presencia de la codeleción 1p/19q no pudo evaluarse. Esta imposibilidad se debió principalmente a la falta de material para optimizar el protocolo de digestión y el sistema de reclutamiento adecuados para lograr señal al menos en los controles internos. Los factores pre-analíticos (manipulación, forma de fijación, calidad de fijador, tiempo de preservación, estado de la muestra) junto con la falta de estandarización y de experiencia en biología molecular para la correcta manipulación del material también fueron factores negativos^{175,176}.

El resumen de los principales resultados respecto de la caracterización integrada de los casos disponibles para estudio es el siguiente:

1- la presencia de codeleción 1p/19q en 9 de los 9 casos analizados indicando el 100% de co-deleción.

Este valor es superior al reportado en la literatura (~85-90%) y podría explicarse porque el estudio únicamente incluyó oligodendrogliomas de morfología clásica provenientes de adultos donde la incidencia de la codeleción 1p/19q es mucho mayor que en jóvenes¹⁷⁷⁻¹⁷⁹;

2- el 100% de los casos evaluados mostró positividad para la proteína IDH1 mutada (R132H). Este resultado es concordante con la literatura, donde más del 90% de las mutaciones en los genes IDH corresponden a la isoforma IDH1 y más del 90% de ellas a la mutación IDH R132H⁶⁴. La señal obtenida fue clara y específica, con una localización predominantemente citoplasmática como se reporta en la literatura⁶⁸;

3- todos los casos presentaron inmunoreactividad para p53 no mutada, tal como ha sido reportado en la literatura para oligodendrogliomas puros donde es rara la presencia de mutaciones en p53 que conlleva la pérdida de expresión de la proteína salvaje^{28,69,164};

4- se detectó ATRX no mutada en el 67% de los casos analizados. A diferencia del reconocimiento de IDH1R132H y de p53, la literatura reporta que para ATRX el reconocimiento antígeno-anticuerpo es muy sensible a variables pre-analíticas variando provocando marcación heterogénea, débil o ausente causando escasa reproducibilidad y altas tasas de fallo en la detección^{153,180-182}. En nuestro estudio, no podemos descartar la influencia de la fijación y el tiempo que la muestra lleva fijada, ya que los resultados mejores se obtuvieron en las muestras más recientes del registro.

ANÁLISIS DE LA VÍA DE TGFβ Y SU CORRELACIÓN CON LA PROLIFERACIÓN CELULAR

En lo referente a la hipótesis de trabajo planteada, los resultados más importantes que obtuvimos pueden resumirse en:

1- se analizaron varios participantes de la vía de TGF β evaluándose su localización, densidad de células positivas e intensidad de la marca: observándose un aumento significativo en OAs respecto de ODs. Es importante resaltar que se optó por evaluar los receptores de la vía de transducción de señales y uno de los efectores capaz de translocarse al núcleo como señal de activación de dicha vía¹⁰⁷. Se descartó analizar la molécula propiamente dicha por varias razones: TGF β es un factor soluble cuya mejor forma de detección es mediante técnicas de ELISA o HPLC y su detección por inmunohistoquímica es altamente sensible a variables preanalíticas como las que están presentes al momento de obtener y preservar muestras¹⁷⁶. Nuestros hallazgos muestran aumento de la inmunoreactividad para TGF β RI y RII así como para Smad4 cuando se comparan los núcleos y los frentes tumorales de OAs con los de los ODs. Estos resultados están de acuerdo con los reportados en la literatura donde proponen a ambos receptores como reguladores de las propiedades de las células madres de gliomas y su vinculación con la progresión tumoral reflejada mediante la adquisición de un fenotipo clínicamente más agresivo^{100,110,115}.

Llamativamente, los aumentos en los índices de Smad4 fueron menores que los aumentos de los índices de los receptores de TGF β probablemente porque se evaluó Smad4 nuclear que es indicador de la activación de la vía. Solo podemos decir que encontramos una relación directa entre los índices de TGF β RII y Smad4, mientras que es necesario un n mayor para evaluar la asociación con TGF β RI. Lamentablemente, ninguno de los anticuerpos que evaluamos para reconocer Smad2 funcionaron. De lo contrario podríamos conocer más claramente la relación entre la expresión de los receptores y la activación de la vía.

Tampoco se observaron cambios en las señales para TGF β RI, TGF β RII y Smad4 cuando se evalúan los endotelios de los diferentes niveles tumorales. Estos resultados podrían explicarse en parte porque la vasculatura en los oligodendrogliomas analizados muestra una morfología conservada, lo que se ha descrito previamente a diferencia de los cambios significativos en los vasos en glioblastomas⁴⁶. Por otra parte, si bien el rol de la vía de TGF β en la angiogénesis y vasculogénesis es conocido, nuestras observaciones podrían indicar que esta vía no tiene una relevancia superlativa en el endotelio durante la transición tumoral de los oligodendrogliomas. Es más, podría tener una importancia secundaria en comparación con otras vías como la dependiente de VEGF y su receptor VEGFR2¹⁸³ o trombospondina-1¹⁸⁴ que muestran aumento de expresión en los OAs y podrían estar relacionados con la inducción de la proliferación endotelial en este nivel. Otros reportes describen a Smad4 como un inhibidor de la angiogénesis mediante la regulación de la expresión de TSP-1 y sVEGFR1¹⁸⁵, por lo que también podría especularse que la presencia de vasos delicados y bien organizados como observamos en los oligodendrogliomas puede deberse a la activación de la vía de TGF β en comparación con lo observado en glioblastomas con vasos con morfologías desorganizadas y anómalas¹⁸⁶;

2- se encontró un aumento significativo de proliferación celular correlacionado con el nivel tumoral. La proliferación celular evaluada por el índice Ki67 mostró aumentos significativos cuando se compararon los ODs con los OAs. Los índices de proliferación encontrados en el estudio son similares a los descritos en la literatura²⁸. Sin embargo, no existe un valor de corte definitivo que permita distinguir entre los distintos niveles de oligodendrogliomas debido a la variabilidad intratumoral, interobservador e interinstitucional que lleva a una jerarquización diferente de los distintos criterios tal como se reporta en la literatura^{187,188}.

Nuestros datos también mostraron concordancia con la literatura que muestra una disminución muy grande de la proliferación en las áreas más alejadas de infiltración¹⁸⁹. Estos valores bajos podrían ser consistentes con el comportamiento menos agresivo que los oligodendrogliomas presentan cuando se comparan a otros gliomas según Fayzullin y cols¹⁹⁰.

Además, los valores encontrados pueden sugerir que los oligodendrogliomas tengan un comportamiento distinto al de gliomas de origen astrocitario. Algunos estudios en cultivos celulares de explantos sólidos de gliomas reportaron que la proliferación mayor es en el sector inmediatamente periférico asociado al componente sólido del tumor pero que rápidamente declina a los pocos milímetros¹⁹¹. A su vez, Coons y Johnson utilizando preparaciones incluidas en totalidad y mapeadas provenientes de autopsias humanas evidenciaron una marcación impredecible y muy variable de Ki67 en gliomas pero excepcional en las células invasoras¹⁹².

Nuestros resultados, sin embargo, muestran que hay proliferación celular escasa pero significativa en las zonas claramente definidas como infiltrantes. Parte del disenso pueda explicarse por diferencias en los criterios para definir los límites entre el *core* y el área de infiltración, lo que parece estar mejor definido en glioblastomas¹⁹³ que en oligodendrogliomas. Tampoco podemos descartar el hecho de que el material utilizado corresponde a resecciones de diversos tipos (completas, parciales, multifragmentadas, en bloque), lo que pudo dificultar la identificación de las regiones y por ende la interpretación de los resultados.

Además, si bien se eligió un método de cuantificación validado por la OMS, el método utilizado es manual y presenta desventajas respecto a los métodos actuales que utilizan inteligencia artificial para evitar la variable inter- e intra- observador¹⁹⁴. De todos modos, la forma de evaluar los índices de proliferación celular en el campo de la oncología está lejos de tener una sola postura y nuestro trabajo solo ayudó a identificar algunos de los problemas que nos enfrentamos al momento de analizar en detalle las distintas zonas;

3- la correlación entre la vía de $TGF\beta$ y la proliferación celular permitió separar los distintos niveles tumorales. La progresión tumoral entendida como un aumento del grado histológico presentó una correlación positiva con la expresión por inmunohistquímica para $TGF\beta$ RI, RII y Smad4. Igual relación se observó al comparar la expresión de estas proteínas con Ki67.

En la literatura no se encontraron referencias específicas que analicen la vía de $TGF\beta$ en relación a la proliferación celular y los estudios previos que incluyeron oligodendrogliomas, emplearon en un número poco representativo y con un análisis morfológico exclusivo^{107,113,117}. En cambio hay estudios similares al que realizamos en astrocitomas difusos, anaplásicos y glioblastomas que evidencian una correlación positiva como la determinada en nuestros casos^{195,196}.

Llamativamente, cada variable analizada ($TGF\beta$ RI, $TGF\beta$ RII, Smad4, Ki67) mostró diferencias significativas cuando se compara el grupo de ODs con el de OAs, pero la correlación entre pares de variables permite una mejor separación entre grupos que eventualmente podría emplearse para decidir el tipo de tumor y la terapéutica consecuente correspondiente a cada nivel. De hecho, si la población fuera más grande, podrían establecerse rangos de pares de valores como predictores de cada nivel y aplicarlo en muestras más grandes. El establecimiento de rangos también podría ser útil en los casos que la morfología no fuera claramente identificable.

Finalmente, se considera que este trabajo permitió un acercamiento al conocimiento mayor de los oligodendrogliomas, un tipo de tumor del SNC que es claramente menos estudiado que los grupos más agresivos. Paradójicamente, el mejor conocimiento de los oligodendrogliomas desde el punto de vista molecular puede ayudar a identificar vías terapéuticas que permitan un abordaje más específico y exitoso. Además, el estudio de vías específicas como la de $TGF\beta$ en relación a la proliferación celular en rango de valores puede ayudar a identificar los niveles tumorales, mientras que la caracterización molecular básica (codeleción 1p/19q, IDH1R132H, ATRX, p53) ayuda fundamentalmente a identificar la estirpe celular.

PERSPECTIVAS

El trabajo realizado indica que fue posible analizar muestras de oligodendrogliomas humanos integrando lo morfológico y lo molecular. Ello permitió confirmar el diagnóstico inicial, comenzar a describir la participación de la vía de TGF β en dos grados de oligodendrogliomas, determinar que el nivel de expresión de actores de esta vía correlacionó con el grado tumoral y que la evaluación conjunta de actores de la misma junto a un índice de proliferación celular permitió reconocer las dos poblaciones tumorales claramente.

Las acciones previstas para continuar este estudio son los siguientes:

1. Aumentar el número de casos a estudiar de oligodendrogliomas clásicos e incluir oligoastrocitomas compuestos por células transformadas de oligodendrocitos y astrocitos y emplear de ser posible, astrocitomas y glioblastomas como controles;
2. Realizar el diagnóstico molecular integrado típico e intentar identificar si existen marcas moleculares de mayor relevancia diagnóstica para cada grado tumoral. Extender los estudios realizados a casos diagnosticados intermedios entre los grados II y III;
3. Analizar otros actores de la vía de TGF β en los casos estudiados y en los de oligodendrogliomas nuevos que puedan obtenerse. De ser posible, comparar los datos obtenidos con los que puedan obtenerse en glioblastomas de los cuales se dispone mayor bibliografía para analizar los resultados en el contexto del conocimiento existente;
4. Profundizar el papel de Smad4 en la regulación del ciclo celular y eventualmente compararla con otros reguladores del mismo como las ciclinas A y D que podrían estar vinculadas con el comportamiento invasivo y la progresión tumoral^{197,198};
5. En este mismo sentido, identificar otras formas de evaluar proliferación celular, no solo mediante Ki67, sino también mediante otros posibles marcadores como PCNA o eventualmente la expresión diferencial de ciclinas tanto a nivel del núcleo tumoral como de las áreas infiltrantes. De confirmarse los valores de proliferación celular obtenidos con Ki67, deberán profundizarse los estudios correlacionales con la vía de TGF β . Ello será útil para intentar encontrar un punto de corte entre los dos niveles tumorales que podría colaborar con la identificación de posibles dianas terapéuticas;
6. No obstante, para comenzar a conocer cuáles son los mecanismos involucrados en la expresión de los marcadores analizados, sería útil contar con un modelo in vitro de oligodendroglioma, lo que puede plantearse como una meta muy a largo plazo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rubin, R. & Strayer, D. *Rubin's pathology clinicopathologic foundations of medicine*. (Wolters Kluwer, 2015).
2. Rubin, R. & Strayer, D. S. *Rubin's pathology*. *Lippincott Williams & Wilkins* **13**, (2008).
3. Coleman, W. B. & Tsongalis, G. J. *Molecular diagnostics: for the clinical laboratorian*. (Springer Science & Business Media, 2006).
4. Pierce, B. A. *Genetics: A conceptual approach*. (Macmillan, 2012).
5. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
6. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* (2000). doi:10.1007/s00262-010-0968-0
7. Anghmed Fouad, Yousef; Aanei, C. Revisiting the hallmarks of cancer. *Am J Cancer Res* **7**, 1016–1036 (2017).
8. Kumar, V., Abbas, A. K. & Aster, J. C. *Robbins basic pathology e-book*. (Elsevier Health Sciences, 2017).
9. Siemann, D. W. Tumor Microenvironment. *Tumor Microenviron.* (2010). doi:10.1002/9780470669891
10. Sonnenschein, C., Soto, A. M., Rangarajan, A. & Kulkarni, P. Competing views on cancer. *J. Biosci.* **39**, 281–302 (2014).
11. Baghban, R. *et al.* Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. *Cell Commun. Signal.* **18**, 1–19 (2020).
12. Costello, L. C. & Franklin, R. B. The genetic/metabolic transformation concept of carcinogenesis. *Cancer Metastasis Rev.* **31**, 123–130 (2012).
13. Vineis, P., Schatzkin, A. & Potter, J. D. Models of carcinogenesis: An overview. *Carcinogenesis* **31**, 1703–1709 (2010).
14. Weston, A. & Harris, C. C. Multistage Carcinogenesis. (2003).
15. Moolgavkar, S. H. & Luebeck, E. G. Multistage Carcinogenesis and the Incidence of Human Cancer. *Genes Chromosom. Cancer* **38**, 302–306 (2003).
16. Moolgavkar, S. H. Commentary: Multistage carcinogenesis and epidemiological studies of cancer. *Int. J. Epidemiol.* **45**, 645–649 (2016).
17. Pitot, H. C. The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer* **72**, 962–970 (1993).
18. Scott, R. E., Wille, J. J. & Wier, M. L. Mechanisms for the Initiation and Promotion of Carcinogenesis: A Review and a New Concept. *Mayo Clin. Proc.* **59**, 107–117 (1984).
19. Weinberg, R. A. *The biology of cancer*. (Garland science, 2013).
20. Wacholder, S. Precursors in Cancer Epidemiology: Aligning Definition and Function. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **22**, 521–527 (2013).
21. Odze, R. D. & Goldblum, J. R. *Odze and Goldblum Surgical Pathology of the GI Tract, Liver, Biliary Tract and Pancreas E-Book*. (Elsevier Health Sciences, 2014).

22. Galon, J. *et al.* Cancer classification using the Immunoscore: A worldwide task force. *J. Transl. Med.* **10**, (2012).
23. Dabbs, D. J. *Diagnostic immunohistochemistry: theranostic and genomic applications*. (Elsevier, 2019).
24. O'Dowd, G., Bell, S. & Wright, S. *Wheater's Pathology: A Text, Atlas and Review of Histopathology E-Book*. (Elsevier Health Sciences, 2019).
25. Tavassoli, F. a. & Devilee, P. Tumours of the Breast and Female Genital Organs. *World Heal. Organ. Classif. Tumours* 259–289 (2003). doi:ISBN 9283224124
26. Jbir, I. *et al.* Tumors of low malignant potential a single institution experience. *Int. J. Surg. Case Rep.* **55**, 41–46 (2019).
27. Gattuso, P., Reddy, V. B., David, O., Spitz, D. J. & Haber, M. H. *Differential Diagnosis in Surgical Pathology E-Book*. (Elsevier Health Sciences, 2014).
28. International Agency for Research on Cancer. *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System (IARC WHO Classification of Tumours)*. World Health Organization (2016).
29. Song, Q., Merajver, S. D. & Li, J. Z. Cancer classification in the genomic era: five contemporary problems. *Hum. Genomics* **9**, 27 (2015).
30. Schweizer, L. *et al.* ATRX and IDH1-R132H immunohistochemistry with subsequent copy number analysis and IDH sequencing as a basis for an “integrated” diagnostic approach for adult astrocytoma, oligodendroglioma and glioblastoma. *Acta Neuropathol.* **129**, 133–146 (2014).
31. Maile, E. J., Barnes, I., Finlayson, A. E., Sayeed, S. & Ali, R. Nervous system and intracranial tumour incidence by ethnicity in England, 2001–2007: A descriptive epidemiological study. *PLoS One* **11**, 2001–2007 (2016).
32. Louis, D. N. *et al.* International Society Of Neuropathology--Haarlem consensus guidelines for nervous system tumor classification and grading. *Brain Pathol.* **24**, 429–435 (2014).
33. Louis, D. N. *et al.* The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* **131**, 803–820 (2016).
34. Komori, T. The 2016 WHO classification of tumours of the central nervous system: The major points of revision. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)*. **57**, 301–311 (2017).
35. Batchelor, Tracy; Nishikawa, Ryo; Tarbell, Nancy; Weller, M. *Oxford Textbook of Neuro-oncology*. (Oxford University Press, USA, 2017).
36. Komori, T. Updated 2016 WHO classification of tumors of the CNS: turning the corner where molecule meets pathology. *Brain Tumor Pathol.* **34**, 139–140 (2017).
37. Pouget, C. *et al.* Ki-67 and MCM6 labeling indices are correlated with overall survival in anaplastic oligodendroglioma, IDH1-mutant and 1p/19q-codeleted: a multicenter study from the French POLA network. *Brain Pathol.* **0**, 1–14 (2019).
38. Ostrom, Q. T. *et al.* Neuro-Oncology CBTRUS Statistical Report : Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the. **21**, 1–100 (2019).
39. WHO. *Who report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all*. World Health Organization (2020).
40. Barrios, E. & Garau, M. Cáncer : magnitud del problema en el mundo y en Uruguay , aspectos epidemiológicos Cancer : magnitude of the problem in the world and in. *AnFaMed* **4**, 9–46

(2017).

41. Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer. Situación Epidemiológica del Uruguay en relación al Cáncer. *Regist. Nac. del Cáncer, Com. Honor. Lucha Contra el Cáncer* 1–61 (2019).
42. Messali, A., Villacorta, R. & Hay, J. W. A Review of the Economic Burden of Glioblastoma and the Cost Effectiveness of Pharmacologic Treatments. *Pharmacoeconomics* **32**, 1201–1212 (2014).
43. Robinson Rodríguez, D., Lombardo, K., Roldán, G., Silvera, J. & Lagomarsino, R. Glioblastoma multiforme cerebral hemisférico. *Rev Méd Urug* **28**, 250–261 (2012).
44. Kros, J. M. Grading of gliomas: The road from eminence to evidence. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **70**, 101–109 (2011).
45. Li, Z. H. *et al.* Astrocytoma progression scoring system based on the WHO 2016 criteria. *Sci. Rep.* **9**, 1–9 (2019).
46. Love, S., Perry, A., Ironside, J. & Budka, H. *Greenfield's Neuropathology-Two Volume Set*. (CRC Press, 2018).
47. Dolecek, T. A., Propp, J. M., Stroup, N. E. & Kruchko, C. CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro. Oncol.* **14**, (2012).
48. Engelhard, H. H., Stelea, A. & Mundt, A. Oligodendroglioma and anaplastic oligodendroglioma: Clinical features, treatment, and prognosis. *Surg. Neurol.* **60**, 443–456 (2003).
49. Yachnis, A. T. & Rivera-Zengotita, M. L. *Neuropathology E-Book: A Volume in the High Yield Pathology Series (Expert Consult-Online and Print)*. (Elsevier Health Sciences, 2012).
50. Ellison, D. *et al.* *Neuropathology E-book: a reference text of CNS pathology*. (Elsevier Health Sciences, 2012).
51. Perry, A. & Brat, D. *Practical Surgical Neuropathology: A Diagnostic Approach. Practical Surgical Neuropathology: A Diagnostic Approach* (2010). doi:10.1016/C2009-0-35968-1
52. Wood, M. D., Halfpenny, A. M. & Moore, S. R. Applications of molecular neuro-oncology - a review of diffuse glioma integrated diagnosis and emerging molecular entities. 1–16 (2019).
53. Karsy, M. *et al.* New Molecular Considerations for Glioma : IDH , ATRX , BRAF ,. *Curr Neurol Neurosci Rep* 17–19 (2017). doi:10.1007/s11910-017-0722-5
54. Brat, D. J. *et al.* cIMPACT-NOW update 3: recommended diagnostic criteria for “Diffuse astrocytic glioma, IDH-wildtype, with molecular features of glioblastoma, WHO grade IV”. *Acta Neuropathol.* **136**, 805–810 (2018).
55. Lee, S. Diffuse Gliomas for Nonneuropathologist: The New Integrated Molecular Diagnostics. 804–814 (2018). doi:10.5858/arpa.2017-0449-RA
56. Califf, R. M. Biomarker definitions and their applications. *Exp. Biol. Med.* **243**, 213–221 (2018).
57. Rodriguez, F. & Ho, C. Y. *Biomarkers in neoplastic neuropathology. Biomarkers in Neoplastic Neuropathology* (2016). doi:10.1007/978-3-319-20931-9
58. Goossens, N., Nakagawa, S., Sun, X. & Hoshida, Y. Cancer biomarker discovery and validation. *Transl. Cancer Res.* **4**, 256–269 (2015).
59. García Martínez, A. Estudio de biomarcadores en gliomas y su utilidad clínica. (Universidad de Alicante, 2016).

60. Dakappagari, N. *et al.* Application of biomarkers in oncology clinical trials. *Clin. Investig. (Lond)*. **5**, 61–74 (2015).
61. Reis, G. F. *et al.* CDKN2A Loss Is Associated with Shortened Overall Survival in Lower-Grade (World Health Organization Grades II-III) Astrocytomas. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **74**, 442–452 (2015).
62. Theeler, B. J., Yung, W. K. A., Fuller, G. N. & De Groot, J. F. Moving toward molecular classification of diffuse gliomas in adults. *Neurology* **79**, 1917–1926 (2012).
63. Huse, J. T. Establishing a Robust Molecular Taxonomy for Diffuse Gliomas of Adulthood. *Surg. Pathol. Clin.* **9**, 379–390 (2016).
64. Wang, X. W. *et al.* IDH mutations: Genotype-phenotype correlation and prognostic impact. *Biomed Res. Int.* **2014**, (2014).
65. Park, S.-H. *et al.* Molecular Testing of Brain Tumor. *J. Pathol. Transl. Med.* **51**, 205–223 (2017).
66. Yan, H. *et al.* IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas A bs tr ac t. *N Engl J Med* **360**, 765–73 (2009).
67. Velázquez, J. E., Daniel, V., Timothy, J. B. & Jeffrey, C. R. The role of neuropathology in the management of newly diagnosed glioblastoma : a systematic review and evidence - based clinical practice guideline. *J. Neurooncol.* **150**, 143–164 (2020).
68. Preusser, M., Capper, D. & Hartmann, C. IDH testing in diagnostic neuropathology: review and practical guideline article invited by the Euro-CNS research committee. *Clin. Neuropathol.* **30**, 217–230 (2011).
69. Sahm, F. *et al.* Farewell to oligoastrocytoma: in situ molecular genetics favor classification as either oligodendroglioma or astrocytoma. *Acta Neuropathol.* **128**, 551–559 (2014).
70. Sturm, D. *et al.* New Brain Tumor Entities Emerge from Molecular Classification of CNS-PNETs. *Cell* **164**, 1060–1072 (2016).
71. Appin, C. L. & Brat, D. J. Molecular pathways in gliomagenesis and their relevance to neuropathologic diagnosis. *Adv. Anat. Pathol.* **22**, 50–58 (2015).
72. Ikemura, M. *et al.* Utility of ATRX immunohistochemistry in diagnosis of adult diffuse gliomas. *Histopathology* **69**, 260–267 (2016).
73. Pekmezci, M. & Perry, A. Practical Molecular Pathologic Diagnosis of Infiltrating Gliomas. *Surg. Pathol. Clin.* **8**, 49–61 (2015).
74. Takami, H. *et al.* Revisiting TP53 mutations and immunohistochemistry - A comparative study in 157 diffuse gliomas. *Brain Pathol.* **25**, 256–265 (2015).
75. Boyd, M. T. & Vlatkovic, N. Europe PMC Funders Group p53 : a molecular marker for the detection of cancer. **2**, 1013–1024 (2016).
76. Bayani, J. & Squire, J. A. Application and interpretation of FISH in biomarker studies. *Cancer Lett.* **249**, 97–109 (2007).
77. Gonzales, M., Dale, S., Susman, M. & Mills, J. Quantitation of chromosome 1p and 19q deletions in glial tumours by interphase FISH on formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *J. Clin. Neurosci.* **13**, 96–101 (2006).
78. Durand, K. S. *et al.* 1p19q LOH patterns and expression of p53 and Olig2 in gliomas: Relation with histological types and prognosis. *Mod. Pathol.* **23**, 619–628 (2010).
79. Pinkham, M. B. *et al.* FISHing Tips: What Every Clinician Should Know About 1p19q Analysis in

- Gliomas Using Fluorescence in situ Hybridisation. *Clin. Oncol.* **27**, 445–453 (2015).
80. Rodriguez, F. & Ho, C. Y. *Biomarkers in neoplastic neuropathology. Biomarkers in Neoplastic Neuropathology* (2016). doi:10.1007/978-3-319-20931-9
 81. Brandner, S. & von Deimling, A. Diagnostic, prognostic and predictive relevance of molecular markers in gliomas. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **41**, 694–720 (2015).
 82. Girard, L., Zochbauer-Muller, S., Virmani, A. K., Gazdar, A. F. & Minna, J. D. Genome-wide allelotyping of lung cancer identifies new regions of allelic loss, differences between small cell lung cancer and non-small cell lung cancer, and loci clustering. *Cancer Res.* **60**, 4894–4906 (2000).
 83. Idowu, M. O., Dumur, C. I. & Garrett, C. T. *Molecular Oncology Testing for Solid Tumors.* (2015).
 84. Nagasaka, T. *et al.* FISH 1p/19q deletion/imbalance for molecular subclassification of glioblastoma. *Brain Tumor Pathol.* **24**, 1–5 (2007).
 85. Woehrer, A. & Hainfellner, J. A. Molecular diagnostics: techniques and recommendations for 1p/19q assessment. *CNS Oncol.* **4**, 295–306 (2015).
 86. Horbinski, C. *et al.* The Importance of 10q Status in an Outcomes-Based Comparison Between 1p / 19q Fluorescence In Situ Hybridization and Polymerase Chain Reaction Y Based Microsatellite Loss of Heterozygosity Analysis of Oligodendrogliomas. **71**, 73–82 (2012).
 87. Moñino, C. C. *Clasificación actual según la OMS de los gliomas infiltrantes. Grupo Español de Investigación en Neurooncología* **14** (2017).
 88. Kim, I. Y., Kim, M. M. & Kim, S. J. Transforming growth factor- β : Biology and clinical relevance. *J. Biochem. Mol. Biol.* **38**, 1–8 (2005).
 89. Roy, L., Poirier, M. & Fortin, D. Transforming growth factor-beta and its implication in the malignancy of gliomas. (2014). doi:10.1007/s11523-014-0308-y
 90. Haque, S. & Morris, J. C. Transforming growth factor- β : A therapeutic target for cancer. *Hum. Vaccines Immunother.* **13**, 1741–1750 (2017).
 91. Neuzillet, C. *et al.* Perspectives of TGF- β inhibition in pancreatic and hepatocellular carcinomas. *Oncotarget* **5**, 78–94 (2014).
 92. Busch, S. *et al.* TGF-beta receptor type-2 expression in cancer-associated fibroblasts regulates breast cancer cell growth and survival and is a prognostic marker in pre-menopausal breast cancer. *Oncogene* **34**, 27–38 (2015).
 93. Wang, X., Chang, X., Facchinetti, V., Zhuang, Y. & Su, B. Proliferation and Survival 1. 1–22 (2009).
 94. Elliott, R. L. & Blobel, G. C. Role of transforming growth factor beta in human cancer. *J. Clin. Oncol.* **23**, 2078–2093 (2005).
 95. Principe, D. R. *et al.* TGF- β : Duality of function between tumor prevention and carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* **106**, 1–16 (2014).
 96. Derynck, R., Akhurst, R. J. & Balmain, A. TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat. Genet.* **29**, 117–129 (2001).
 97. Liu, S., Chen, S. & Zeng, J. TGF- β signaling: A complex role in tumorigenesis (Review). *Mol. Med. Rep.* **17**, 699–704 (2018).
 98. Hino, O. & Kobayashi, T. Mourning Dr. Alfred G. Knudson: the two-hit hypothesis, tumor suppressor genes, and the tuberous sclerosis complex. *Cancer Sci.* **108**, 5–11 (2017).

99. Korkut, A. *et al.* HHS Public Access Alterations in Mediators of Signaling by the TGF- β Superfamily. *Cell Syst* **7**, 422–437 (2018).
100. Narushima, Y. *et al.* Integrative network analysis combined with quantitative phosphoproteomics reveals transforming growth factor-beta receptor type-2 (TGFB2) as a novel regulator of glioblastoma stem cell properties. *Mol. Cell. Proteomics* **15**, 1017–1031 (2016).
101. Wakefield, L. TGF- β signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**, 22–29 (2002).
102. Ikushima, H. & Miyazono, K. TGFB2 signalling: A complex web in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 415–424 (2010).
103. Muñoz, N. M., Baek, J. Y. & Grady, W. M. TGF- β has paradoxical and context dependent effects on proliferation and anoikis in human colorectal cancer cell lines. *Growth Factors* **26**, 254–262 (2008).
104. Shu, D. Y., Hutcheon, A. E. K., Zieske, J. D. & Guo, X. Epidermal Growth Factor Stimulates Transforming Growth Factor-Beta Receptor Type II Expression In Corneal Epithelial Cells. *Sci. Rep.* **9**, 1–11 (2019).
105. Roy, L. O., Poirier, M. B. & Fortin, D. Differential expression and clinical significance of transforming growth factor-beta isoforms in GBM tumors. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
106. Zhao, M., Mishra, L. & Deng, C. X. The role of TGF- β /SMAD4 signaling in cancer. *Int. J. Biol. Sci.* **14**, 111–123 (2018).
107. Roy, L. O., Poirier, M. B. & Fortin, D. Transforming growth factor-beta and its implication in the malignancy of gliomas. *Target. Oncol.* **10**, (2015).
108. Vander Ark, A., Cao, J. & Li, X. TGF- β receptors: In and beyond TGF- β signaling. *Cell. Signal.* **52**, 112–120 (2018).
109. Matiller, V. *et al.* Expression of TGFB1, TGFB2, TGFB3, ACVR1B and ACVR2B is altered in ovaries of cows with cystic ovarian disease. *Reprod. Domest. Anim.* **54**, 46–54 (2019).
110. Rojas, A., Padidam, M., Cress, D. & Grady, W. M. TGF- β receptor levels regulate the specificity of signaling pathway. **1793**, 1165–1173 (2010).
111. Vilorio-Petit, A., Richard, A., Zours, S., Jarad, M. & Coomber, B. L. Role of transforming growth factor beta in angiogenesis. *Biochem. Basis Ther. Implic. Angiogenes.* 23–45 (2013). doi:10.1007/978-1-4614-5857-9_2
112. Liu, F., Wang, H. & Zhang, M. Distinct prognostic values and antitumor effects of tumor growth factor β 1 and its receptors in gastric cancer. *Oncol. Lett.* **20**, 2621–2632 (2020).
113. Docea, A. O. *et al.* Immunohistochemical expression of TGF beta (TGF- β), TGF beta receptor 1 (TGFB1), and Ki67 in intestinal variant of gastric adenocarcinomas. *Rom. J. Morphol. Embryol.* **53**, 683–692 (2012).
114. Valle, L. *et al.* Germline Allele-Specific Expression of TGFB1 Confers an Increased Risk of Colorectal Cancer. *Science (80-.).* **321**, 1361–1365 (2008).
115. Pasche, B., Pennison, M. J., Jimenez, H. & Wang, M. TGFB1 and cancer susceptibility. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* **125**, 300–312 (2014).
116. Gao, Y. *et al.* Constitutively active transforming growth factor β receptor 1 in the mouse ovary promotes tumorigenesis. *Oncotarget* **7**, 40904–40918 (2016).

117. Yamada, N. *et al.* Enhanced expression of transforming growth factor-beta and its type-I and type-II receptors in human glioblastoma. *Int. J. cancer* **62**, 386–392 (1995).
118. Song, K. *et al.* ERBB3, IGF1R, and TGFBR2 expression correlate with PDGFR expression in glioblastoma and participate in PDGFR inhibitor resistance of glioblastoma cells. *Am. J. Cancer Res.* **8**, 792–809 (2018).
119. Nadauld, L. D. *et al.* Metastatic tumor evolution and organoid modeling implicate TGFBR2 as a cancer driver in diffuse gastric cancer. *Genome Biol.* **15**, 428 (2014).
120. Jiang, L. *et al.* Overexpression of SMC4 activates TGF β /Smad signaling and promotes aggressive phenotype in glioma cells. *Oncogenesis* **6**, e301–e301 (2017).
121. Wong, M. L. H., Prawira, A., Kaye, A. H. & Hovens, C. M. Tumour angiogenesis : Its mechanism and therapeutic implications in malignant gliomas. *J. Clin. Neurosci.* **16**, 1119–1130 (2009).
122. Corteze Netto, G., Birlem Bleil, C., Hilbig, A. & Barbosa Coutinho, L. M. Immunohistochemical evaluation of the microvascular density through the expression of TGF- β (CD 105/endoglin) and CD 34 receptors and expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) in oligodendrogliomas. *Neuropathology* **28**, 17–23 (2008).
123. Viñals, F. & Pouyssegur, J. Transforming Growth Factor β 1 (TGF- β 1) Promotes Endothelial Cell Survival during In Vitro Angiogenesis via an Autocrine Mechanism Implicating TGF- α Signaling. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 7218–7230 (2001).
124. Nakagawa, T. *et al.* TGF- β induces proangiogenic and antiangiogenic factors via parallel but distinct Smad pathways. *Kidney Int.* **66**, 605–613 (2004).
125. Batlle, E. & Massagué, J. Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity* **50**, 924–940 (2019).
126. Ravi, R. *et al.* Bifunctional immune checkpoint-targeted antibody-ligand traps that simultaneously disable TGF β enhance the efficacy of cancer immunotherapy. *Nat. Commun.* **9**, (2018).
127. Block, K. I. *et al.* Designing a broad-spectrum integrative approach for cancer prevention and treatment. *Semin. Cancer Biol.* **35**, S276–S304 (2015).
128. Jakola, A. S. *et al.* Surgical resection versus watchful waiting in low-grade gliomas. *Ann. Oncol.* **28**, 1942–1948 (2017).
129. Abrey, L. E. *et al.* Survey of treatment recommendations for anaplastic oligodendroglioma. *Neuro. Oncol.* **9**, 314–318 (2007).
130. Bae, S. H. *et al.* Toxicity profile of temozolomide in the treatment of 300 malignant glioma patients in Korea. *J. Korean Med. Sci.* **29**, 980–984 (2014).
131. Brown, T. J. *et al.* Association of the Extent of Resection With Survival in Glioblastoma. *JAMA Oncol.* **2**, 1460 (2016).
132. Young, R. M., Jamshidi, A., Davis, G. & Sherman, J. H. Current trends in the surgical management and treatment of adult glioblastoma. *Ann. Transl. Med.* **3**, 1–15 (2015).
133. Sepúlveda-Sánchez, J. M. *et al.* SEOM clinical guideline of diagnosis and management of low-grade glioma (2017). *Clin. Transl. Oncol.* **20**, 3–15 (2018).
134. Mineharu, Y. *et al.* Gene Therapy-Mediated Reprogramming Tumor Infiltrating T Cells Using IL-2 and Inhibiting NF- κ B Signaling Improves the Efficacy of Immunotherapy in a Brain Cancer Model. *Neurotherapeutics* **9**, 827–843 (2012).

135. Mohammad, K. S. *et al.* TGF- β Kinase Inhibitor SD-208 Reduces the Development and Progression of Melanoma Bone Metastases. *Cancer Res.* **71**, 175–184 (2011).
136. Watson, P. & Watson, P. Expert Review of Anticancer Therapy mans-land in cancer research The importance of tumor banking : bridging no-mans-land in cancer research. **7140**, (2014).
137. Buijs, J. T., Stayrook, K. R. & Guise, T. A. The role of TGF- β in bone metastasis: novel therapeutic perspectives. *Bonekey Rep.* **1**, 1–10 (2012).
138. Sterchi, D. & Bancroft, J. *Bancroft's theory and practice of histological techniques. Bancroft's theory and practice of histological techniques* (2013).
139. Teng, X., Zhang, S., Liu, W., Bi, K. & Zhang, L. A new method for real-time evaluation of pepsin digestion of paraffin-embedded tissue sections, prior to fluorescence in situ hybridisation. *Virchows Arch.* **470**, 567–573 (2017).
140. Duval, C., Tayrac, M. De, Michaud, K., Cabillic, F. & Paquet, C. Automated Analysis of 1p / 19q Status by FISH in Oligodendroglial Tumors : Rationale and Proposal of an Algorithm. 1–17 (2015). doi:10.1371/journal.pone.0132125
141. Ambros, P. F. & Ambros, I. M. Pathology and Biology Guidelines for Resectable and Unresectable Neuroblastic Tumors and Bone Marrow Examination Guidelines. 492–504 (2001).
142. de Matos, L. L., Trufelli, D. C., de Matos, M. G. L. & Pinhal, M. A. da S. Immunohistochemistry as an important tool in biomarkers detection and clinical practice. *Biomark. Insights* **2010**, 9–20 (2010).
143. O'Rourke, M. B. & Padula, M. P. Analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue via proteomic techniques and misconceptions of antigen retrieval. *Biotechniques* **60**, 229–238 (2016).
144. Lin, F., Prichard, J. & Wilkerson, M. *Handbook of Practical Immunohistochemistry*. (Springer New York, 2015). doi:10.1007/978-1-4939-1578-1
145. Bayin, N. S. *et al.* Patient-Specific Screening Using High-Grade Glioma Explants to Determine Potential Radiosensitization by a TGF- β Small Molecule Inhibitor. *Neoplasia* **18**, 795–805 (2016).
146. Guo, S.-K., Shen, M.-F., Yao, H.-W. & Liu, Y.-S. Enhanced Expression of TGFBI Promotes the Proliferation and Migration of Glioma Cells. *Cell. Physiol. Biochem.* **49**, 1138–1150 (2018).
147. Bastola, S. *et al.* Glioma-initiating cells at tumor edge gain signals from tumor core cells to promote their malignancy. *Nat. Commun.* **11**, 1–17 (2020).
148. College of American Pathologists. Template for Reporting Results of Biomarker Testing of Specimens From Patients With Carcinoma of the Breast. **4**, 1–15 (2020).
149. Sun, X. & Kaufman, P. D. Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma* **127**, 175–186 (2018).
150. Prayson, R. A. *et al.* Interobserver variability in determining MIB-1 labeling indices in oligodendrogliomas. *Ann. Diagn. Pathol.* **7**, 9–13 (2003).
151. Yang, Z., Tang, L. H. & Klimstra, D. S. Effect of tumor heterogeneity on the assessment of Ki67 labeling index in well-differentiated neuroendocrine tumors metastatic to the liver: Implications for prognostic stratification. *Am. J. Surg. Pathol.* **35**, 853–860 (2011).
152. Hattab, E. M. *et al.* Protocol for the Examination of Specimens from Patients with Tumors of the Central Nervous System. (2018).

153. Deimling, V. ATRX loss refines the classification of anaplastic gliomas and identifies a subgroup of IDH mutant astrocytic tumors with better prognosis ATRX loss refines the classification of anaplastic gliomas and identifies a subgroup of IDH mutant astrocytic tumors. (2013).
154. Yemelyanova, A. *et al.* Immunohistochemical staining patterns of p53 can serve as a surrogate marker for TP53 mutations in ovarian carcinoma: An immunohistochemical and nucleotide sequencing analysis. *Mod. Pathol.* **24**, 1248–1253 (2011).
155. Köbel, M. *et al.* Interpretation of P53 Immunohistochemistry in Endometrial Carcinomas: Toward Increased Reproducibility. *Int. J. Gynecol. Pathol.* **38**, S123–S131 (2019).
156. Xu, M. L. *et al.* Practical Approaches on CD30 Detection and Reporting in Lymphoma Diagnosis. *Am. J. Surg. Pathol.* **44**, E1–E14 (2020).
157. Cohen, D. A. *et al.* Interobserver agreement among pathologists for semiquantitative hormone receptor scoring in breast carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.* **138**, 796–802 (2012).
158. Nakamura, R. *et al.* The relation between anti-TGBFR1 immunohistochemical reaction and low Ki67, small tumor size and high estrogen receptor expression in invasive breast cancer. *Pathol. Int.* **70**, 330–339 (2020).
159. Numata, M. *et al.* The clinical significance of SWI/SNF complex in pancreatic cancer. *Int. J. Oncol.* **42**, 403–410 (2013).
160. Weger, E., Levsen, K., Zwinselman, J. & Harrison, A. G. Immunohistochemical Labeling for DPC4 mirrors genetic status in pancreatica adenocarcinomas. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* **65**, 231–233 (1985).
161. Kleeff, J. *et al.* Overexpression of Smad2 and colocalization with TGF- β 1 in human pancreatic cancer. *Dig. Dis. Sci.* **44**, 1793–1802 (1999).
162. Sonoda, Y. *et al.* Practical procedures for the integrated diagnosis of astrocytic and oligodendroglial tumors. *Brain Tumor Pathol.* **0**, 0 (2019).
163. Lapointe, S., Perry, A. & Butowski, N. A. Seminar Primary brain tumours in adults. *Lancet* **6736**, 1–15 (2018).
164. Matsuda, M. *et al.* Immunohistochemistry on IDH 1/2, ATRX, p53 and Ki-67 substitute molecular genetic testing and predict patient prognosis in grade III adult diffuse gliomas. *Brain Tumor Pathol.* **33**, 107–116 (2016).
165. Rajeswarie, R. T., Rao, S., Nandeesh, B. N. & Yasha, T. C. A simple algorithmic approach using histology and immunohistochemistry for the current classification of adult diffuse glioma in a resource-limited set-up. 1–8 (2017). doi:10.1136/jclinpath-2017-204638
166. Reuss, D. E. *et al.* ATRX and IDH1 R132H immunohistochemistry with subsequent copy number analysis and IDH sequencing as a basis for an “integrated” diagnostic approach for adult astrocytoma, oligodendroglioma and glioblastoma. *Acta Neuropathol.* **129**, 133–146 (2015).
167. Ostrom, Q. T., Wright, C. H. & Barnholtz-Sloan, J. S. *Brain metastases: epidemiology. Handbook of Clinical Neurology* **149**, (Elsevier B.V., 2018).
168. Davis, M. E. Epidemiology and Overview of Gliomas. *Semin. Oncol. Nurs.* **34**, 420–429 (2018).
169. Sgarbi, Nicolas; Telis, O. Espectroscopía por resonancia magnética en gliomas de bajo grado: patrones metabólicos y rol en el diagnóstico. *Rev. Oncol. Médica* **11**, 1689–1699 (2019).
170. Ostrom, Q. T. *et al.* The epidemiology of glioma in adults: A state of the science review. *Neuro. Oncol.* **16**, 896–913 (2014).

171. Leece, R. *et al.* Global incidence of malignant brain and other central nervous system tumors by histology, 2003-2007. *Neuro. Oncol.* **19**, 1553–1564 (2017).
172. Rodríguez-Flrido, M. A. *et al.* Evaluación semicuantitativa de gliomas cerebrales en adultos: Un enfoque de las características neuropatológicas. *Gac. Med. Mex.* **155**, 473–480 (2019).
173. Davis, F. G. *et al.* Issues of diagnostic review in brain tumor studies: From the brain tumor epidemiology consortium. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **17**, 484–489 (2008).
174. Reuss, D. E. *et al.* ATRX and IDH1-R132H immunohistochemistry with subsequent copy number analysis and IDH sequencing as a basis for an “integrated” diagnostic approach for adult astrocytoma, oligodendroglioma and glioblastoma. *Acta Neuropathol.* **129**, 133–146 (2015).
175. Narayanan, S. The preanalytic phase: An important component of laboratory medicine. *Am. J. Clin. Pathol.* **113**, 429–452 (2000).
176. Susman, S. *et al.* The role of the pathology department in the preanalytical phase of molecular analyses. *Cancer Manag. Res.* **10**, 745–753 (2018).
177. Rodriguez, F. J. *et al.* Clinicopathologic Features of Pediatric Oligodendrogliomas. *Am. J. Surg. Pathol.* **38**, 1058–1070 (2014).
178. Suri, V. *et al.* Molecular profile of oligodendrogliomas in young patients. *Neuro. Oncol.* **13**, 1099–1106 (2011).
179. Aldape, K., Burger, P. C. & Perry, A. Clinicopathologic aspects of 1p/19q loss and the diagnosis of oligodendroglioma. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **131**, 242–251 (2007).
180. Purkait, S. *et al.* ATRX in Diffuse Gliomas With its Mosaic/Heterogeneous Expression in a Subset. *Brain Pathol.* **27**, 138–145 (2017).
181. Ikemura, M. *et al.* Utility of ATRX immunohistochemistry in diagnosis of adult diffuse gliomas. *Histopathology* **69**, 260–267 (2016).
182. Yamamichi, A. *et al.* Immunohistochemical ATRX expression is not a surrogate for 1p19q codeletion. *Brain Tumor Pathol.* **0**, 1–8 (2018).
183. Lugano, R., Ramachandran, M. & Dimberg, A. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cell. Mol. Life Sci.* **77**, 1745–1770 (2020).
184. Watnick, R. S. The role of the tumor microenvironment in regulating angiogenesis. *Biomarkers Tumor Microenviron. Basic Stud. Pract. Appl.* 3–23 (2017). doi:10.1007/978-3-319-39147-2_1
185. Hashmi, A. A. *et al.* Morphologic spectrum of glial tumors: An increased trend towards oligodendroglial tumors in Pakistan. *Int. Arch. Med.* **7**, 1–6 (2014).
186. Das, S. & Marsden, P. A. Angiogenesis in Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **369**, 1561–1563 (2013).
187. Maruno, M., Kovach, J. S., Kelly, P. J. & Yanagihara, T. Transforming growth factor- α , epidermal growth factor receptor, and proliferating potential in benign and malignant gliomas. *J. Neurosurg.* **75**, 97–102 (1991).
188. Jham, R. *et al.* Correlation of the proliferative markers (AgNOR and Ki-67) with the histological grading of the glial tumors. *J. Datta Meghe Inst. Med. Sci. Univ.* **12**, 211 (2017).
189. Chiesa-Vottero, A. G., Rybicki, L. A. & Prayson, R. A. Comparison of Proliferation Indices in Glioblastoma Multiforme by Whole Tissue Section vs Tissue Microarray. *Am. J. Clin. Pathol.* **120**, 902–908 (2003).
190. Fayzullin, A. *et al.* Phenotypic and Expressional Heterogeneity in the Invasive Glioma Cells.

Transl. Oncol. **12**, 122–133 (2019).

191. Haynes, L. W., Davis, B. E., Mitchell, J. & Weller, R. O. Cell proliferation in explant cultures of malignant gliomas. *Acta Neuropathol.* **42**, 87–90 (1978).
192. Coons, S. W. & Johnson, P. C. Regional Heterogeneity in the Proliferative Activity of Human Gliomas as Measured by the Ki-67 Labeling Index. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **52**, 609–618 (1993).
193. Dalrymple, S. J. *et al.* Changes in Proliferating Cell Nuclear Antigen Expression in Glioblastoma Multiforme Cells along a Stereotactic Biopsy Trajectory. *Neurosurgery* **35**, 1036–1045 (1994).
194. Nielsen, L. A. G. *et al.* Evaluation of the proliferation marker Ki-67 in gliomas: Interobserver variability and digital quantification. *Diagn. Pathol.* **13**, 1–8 (2018).
195. Kjellman, C. *et al.* Expression of TGF- β isoforms, TGF- β receptors, and Smad molecules at different stages of human glioma. *Int. J. Cancer* **89**, 251–258 (2000).
196. Bruna, A. *et al.* High TGF β -Smad Activity Confers Poor Prognosis in Glioma Patients and Promotes Cell Proliferation Depending on the Methylation of the PDGF-B Gene. *Cancer Cell* **11**, 147–160 (2007).
197. Allan, K., Jordan, R. C. K., Ang, L. C., Taylor, M. & Young, B. Overexpression of cyclin A and cyclin B1 proteins in astrocytomas. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **124**, 216–220 (2000).
198. Mahzouni, P. & Taheri, F. An immunohistochemical study of cyclin D1 expression in astrocytic tumors and its correlation with tumor grade. *Iran. J. Pathol.* **14**, 252–257 (2019).