

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO



**PAPEL PRONÓSTICO DE LA RESPUESTA AL MAL
PLEGAMIENTO DE PROTEÍNAS EN DISTINTOS GRUPOS
MOLECULARES DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME**

RODRIGO FERNÁNDEZ GAJARDO

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS Y
ESPECIALIDAD EN NEUROCIRUGÍA**

Directores: Dr. Claudio Hetz

Director de tesis

Profesor Titular. Laboratorio de Estrés Celular y Biomedicina, Instituto de Neurociencia Biomédica, Facultad de Medicina – Universidad de Chile

Dr. David Rojas

Co-director de tesis

Profesor Asistente de Neurocirugía. Departamento de Ciencias Neurológicas Oriente, Facultad de Medicina – Universidad de Chile

Dr. José Manuel Matamala

Co-director de tesis

Profesor Asociado de Neurología. Departamento de Ciencias Neurológicas Oriente, Departamento de Neurociencia, Facultad de Medicina – Universidad de Chile

AÑO 2021

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

**INFORME DE APROBACION TESIS DE DOCTORADO EN
CIENCIAS MEDICAS Y ESPECIALIDAD**

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Doctorado en Ciencias Médicas presentada por el candidato

RODRIGO FERNÁNDEZ GAJARDO

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Doctor en Ciencias Médicas y Especialidad** en Examen de Defensa de Tesis rendido el día

**DR. CLAUDIO HETZ
DIRECTOR DE TESIS**

COMISION INFORMANTE DE TESIS

PROF. DRA. KATHERINE MARCELAIN

PROF. DRA. MARIANA SINNING

PROF. DRA. CLAUDIA QUEZADA

PROF. DR. ENRIQUE CASTELLÓN

Presidente Comisión de Examen

DEDICATORIA

Este proyecto de tesis está dedicado a todos los pacientes con cáncer cerebral que he podido conocer durante el desarrollo de este estudio, porque todos estuvieron felices de participar, sólo por la posibilidad de ayudar a alguien más.

Seguiremos trabajando para que nuestros resultados realmente puedan ayudar a alguien más.

AGRADECIMIENTOS

Son demasiadas las personas sin las que este proyecto no hubiera sido posible, o hubiera sido increíblemente más difícil. Espero haber demostrado mi agradecimiento en persona, lo suficiente para que ninguno de los que no llegan a estas líneas no tengan duda alguna de su valiosa contribución.

A mis directores de tesis, que me apoyaron de forma realmente incondicional durante todos estos años de trabajo. A José Manuel: gracias por las incontables horas de conversaciones, de revisiones, de críticas constructivas, por todo lo que aportaste a esta tesis, y quizá principalmente por tu dedicación desinteresada a un proyecto alejado de tus áreas de trabajo. A David: gracias por la comprensión, por la paciencia, por las múltiples reuniones de discusión, por la humildad de trabajar codo a codo en el proyecto, y por confiar en mí desde el principio de esta larga y ambiciosa neurocirugía. A Claudio: gracias por las ganas de desarrollar este proyecto en conjunto, por enseñarme a pensar de forma crítica, por la generosidad con tu conocimiento y por recibirme en la “familia” del laboratorio Hetz con todas las peculiaridades que tiene el trabajo de un médico en las ciencias básicas.

A Hery Urra, el “cuarto director” de este proyecto: gracias por enseñarme todo lo que necesité en el laboratorio, por presionarme a ser independiente pero estar para la llamada de fin de semana, y por hacer las cosas bien para guiar con el ejemplo.

A mi hospital, a sus autoridades y a su increíble equipo humano. A mi Universidad de toda la vida, en especial a las personas detrás de este programa: María Elena, Alejandra y Cecilia.

A mi mamá, con su paciencia infinita, hablando unos minutos todos los días... aunque generalmente sin hablar de “la tesis”. Porque estuvo y está ahí, y porque fue y sigue siendo un apoyo fundamental en todos los momentos difíciles; y han habido muchos momentos.

Esta tesis se imprime en muchas copias.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1	ÍNDICE DE FIGURAS	7
2	ÍNDICE DE TABLAS Y ANEXOS	9
3	ABREVIACIONES	11
4	RESUMEN	13
5	ABSTRACT	14
6	INTRODUCCIÓN	15
6.1	Glioblastoma Multiforme (GBM) – Generalidades y Clasificación.....	15
6.2	Mutaciones de IDH1/2.....	16
6.3	Mutaciones de TERTp.....	17
6.4	Amplificación de EGFR	17
6.5	Medicina Personalizada	18
6.6	Respuesta al Mal Plegamiento de Proteínas (UPR).....	18
6.7	Vías de Señalización de UPR	19
6.8	UPR en GBM.....	20
6.9	UPR y Marcadores Genéticos.....	22
7	HIPÓTESIS	24
8	OBJETIVOS	24
8.1	Objetivo General:.....	24
8.2	Objetivos Específicos:	24
9	MÉTODOS	25
9.1	Reclutamiento y selección de pacientes.....	25
9.2	Seguimiento clínico e imagenológico.....	25
9.3	Obtención y manejo de muestras	27
9.4	Secuenciación masiva paralela (NGS) y análisis bioinformático	29
9.4.1	Diseño de paneles de secuenciación.....	29
9.4.2	Extracción de DNA	30
9.4.3	Preparación de librerías.....	31
9.4.4	Secuenciación Masiva Paralela (NGS)	33
9.4.5	Análisis bioinformático	34

9.5	Extracción de RNA y proteínas	35
9.6	qRT-PCR.....	36
9.7	Western blot.....	37
9.8	VARIABLES DE ESTUDIO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	38
9.9	Consideraciones Éticas	40
10	RESULTADOS	41
10.1	Pacientes	41
10.2	Desenlace clínico	42
10.3	Resultados – Objetivo 1	44
10.3.1	Métricas de secuenciación.....	44
10.3.2	Análisis de número de copias de EGFR.....	46
10.3.3	Frecuencia de mutaciones de TERTp e IDH1/2.....	46
10.4	Resultados – Objetivo 2	49
10.4.1	Niveles de expresión génica en tejido tumoral.....	49
10.4.2	Determinación de niveles de proteínas relacionadas a UPR en tejido tumoral	58
10.4.3	Activación de UPR y expresión de distintos marcadores de cáncer	63
10.5	Resultados – Objetivo 3	64
10.5.1	Activación de UPR y marcadores de cáncer en distintos grupos moleculares de GBM.....	64
10.5.2	Análisis de sobrevida – Comparación entre grupos y variables pronósticas.....	74
10.5.3	Activación de UPR y marcadores de cáncer – relación con otras variables clínicas	84
11	DISCUSIÓN	86
11.1	Principales hallazgos del estudio	86
11.2	Relevancia de los resultados	90
11.3	Proyecciones del estudio.....	91
11.4	Limitaciones del estudio	95
11.5	Conclusiones	96
12	REFERENCIAS	97

1 ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imágenes representativas de segmentación manual de áreas de captación de contraste en Resonancia Magnética (RM).....	27
Figura 2. Representación esquemática del protocolo de trabajo	28
Figura 3. Amplificación de IDH1, IDH2 y promotor de TERT para generación de librerías Truseq nano DNA.....	31
Figura 4. Electroferogramas representativos de librerías Ampliseq	33
Figura 5. Desenlace clínico de pacientes con gliomas de alto grado, determinado mediante sobrevida global y sobrevida libre de progresión	43
Figura 6. Número de lecturas sobre posiciones de interés en secuenciación masiva paralela de los genes TERTp, IDH1/2 y EGFR, para cada paciente.	45
Figura 7. Análisis de variación de número de copias de EGFR mediante secuenciación masiva paralela.....	47
Figura 8. Representación gráfica de los resultados de secuenciación masiva paralela para los genes de interés.	48
Figura 9. Niveles de mRNA en tejido tumoral de gliomas de alto grado, presentados como razón de cambio en comparación a tejido cerebral control, y como z-score.	50
Figura 10. Correlación entre niveles de expresión de genes asociados a UPR – cáncer y componentes principales PC1 y PC2..	52
Figura 11. Análisis de clústers jerárquicos con doble dendrograma – Mapa de colores de expresión génica.....	53
Figura 12. Análisis de clústers jerárquicos de un dendrograma – Mapa de colores de expresión génica de marcadores de UPR.....	57
Figura 13. Niveles de proteínas de UPR en pacientes con gliomas de alto grado y tejido control (Western blot).....	58
Figura 14. Niveles de proteínas de UPR en tejido tumoral de gliomas de alto grado, presentados como razón de cambio en comparación a tejido cerebral control, y como z-score.....	59
Figura 15. Matriz de correlaciones entre variables de UPR y otros procesos de cáncer, a nivel de mRNA y proteínas	62
Figura 16. Niveles de expresión génica de los distintos marcadores de inflamación, angiogénesis e invasión tumoral, en grupos de pacientes definidos según nivel de activación de UPR	63

Figura 17. Niveles de expresión génica de marcadores de UPR y otros procesos de cáncer en distintos grupos genéticos.	65
Figura 18. Niveles de expresión génica de los marcadores de UPR – cáncer del clúster 1, en grupos de pacientes definidos por la presencia de mutaciones de TERTp e IDH1/2	67
Figura 19. Niveles de expresión génica de los marcadores de UPR – cáncer del clúster 2, en grupos de pacientes definidos por la presencia de mutaciones de TERTp e IDH1/2	68
Figura 20. Niveles de expresión génica de los marcadores de UPR – cáncer del clúster 3, en grupos de pacientes definidos por la presencia de mutaciones de TERTp e IDH1/2	69
Figura 21. Niveles proteicos de marcadores de UPR en distintos grupos genéticos.....	70
Figura 22. Niveles proteicos de los distintos marcadores de UPR en grupos de pacientes definidos por la presencia de mutaciones de TERTp e IDH1/2	72
Figura 23. Niveles proteicos de los distintos marcadores de UPR en grupos de pacientes definidos por la presencia de amplificación de EGFR y mutaciones de IDH1/2	73
Figura 24. Desenlace clínico de pacientes con distintos marcadores genéticos, determinado mediante sobrevida global y sobrevida libre de progresión	76
Figura 25. Desenlace clínico de pacientes con distintos niveles de activación de UPR, determinado mediante sobrevida global y sobrevida libre de progresión	78
Figura 26. Desenlace clínico de pacientes clasificados en distintos grupos, según categorización jerárquica basada en expresión génica de UPR y otros procesos de cáncer, determinado mediante sobrevida global y sobrevida libre de progresión.....	79
Figura 27. Correlación de niveles proteicos de BiP y volumen tumoral preoperatorio (T1-Gd) en pacientes con gliomas de alto grado	85

2 ÍNDICE DE TABLAS Y ANEXOS

Tabla 1. Secuencias de partidores evaluadas en la amplificación de regiones de interés de los genes IDH1, IDH2 y TERTp.....	32
Tabla 2. Secuencias de partidores utilizadas para qRT-PCR de marcadores de UPR y otros procesos de cáncer	37
Tabla 3. Anticuerpos utilizados para Western blot de marcadores de UPR.....	38
Tabla 4. Variables clínicas y demográficas más relevantes de los pacientes con gliomas de alto grado.....	42
Tabla 5. Regresiones lineales univariable de niveles de expresión génica sobre variables clínicas y comorbilidades de los pacientes.....	55
Tabla 6. Modelos de regresión multivariable para CHOP y XBP1s, sobre variables seleccionadas en regresiones univariable	55
Tabla 7. Comparación de frecuencias de uso de corticoides, HTA, protocolo de manejo de muestras y tabaquismo entre pacientes con distintos marcadores genéticos	56
Tabla 8. Regresiones lineales univariable de niveles de proteínas de UPR sobre variables clínicas y comorbilidades de los pacientes.....	60
Tabla 9. Modelos de regresión multivariable para ERp57 y BiP (proteínas).....	61
Tabla 10. Distribución de pacientes con altos niveles de UPR y bajos niveles de UPR en los distintos grupos genéticos	74
Tabla 11. Modelos de regresión univariable para posibles variables pronósticas de sobrevida global en pacientes con gliomas de alto grado.....	80
Tabla 12. Modelo de regresión multivariable para posibles variables pronósticas de sobrevida global en pacientes con gliomas de alto grado.....	81
Tabla 13. Modelos de regresión univariable para factores clínicos, histopatológicos y genéticos con valor pronóstico conocido de sobrevida global en pacientes con gliomas de alto grado	82
Tabla 14. Modelo final de regresión multivariable para posibles factores pronósticos de sobrevida global en pacientes con gliomas de alto grado	83

Tabla Suplementaria 1. Protocolo de generación de librerías Ampliseq.....	106
Tabla Suplementaria 2. Protocolo de generación de librerías Truseq	107
Tabla Suplementaria 3. Coordenadas de amplicones diseñados para librerías Ampliseq, sobre genes de interés IDH1, IDH2 y EGFR	108
Tabla Suplementaria 4. Comorbilidades y uso de medicamentos detallados, de pacientes con gliomas de alto grado incluidos en el estudio	112
Tabla Suplementaria 5. Presentación clínica y desenlaces clínicos de pacientes con gliomas de alto grado incluidos en el estudio	114
Tabla Suplementaria 6. Razones de amplificación de EGFR en comparación a pacientes controles sanos, calculadas en base a análisis de secuenciación de amplicones, mediante el programa CNVpanelizer	116
Anexo N°1. Consentimientos informados	117
Anexo N°2. Acta de aprobación Comité de Ética Científica del Servicio de Salud Metropolitano Oriente	121
Anexo N°3. Acta de aprobación Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.....	123
Anexo N°4. Evaluaciones clínicas.....	125
Anexo N°5. Criterios de progresión de enfermedad.....	129

3 ABREVIACIONES

ATF6 = Factor de transcripción activador 6

ATF3 = Factor de transcripción activador 3

ATRX = gen de alfa-talasemia relacionada al cromosoma X

BiP = Binding immunoglobulin protein – proteína de unión a inmunoglobulinas

CD14 = Clúster de diferenciación 14

CD31 = Clúster de diferenciación 31

CDKN2A = Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina, 2A

cDNA = Ácido desoxirribonucleico complementario

CHOP = Proteína homóloga a C/EBP (proteína de unión a activadores)

Cyr61 = Inductor angiogénico rico en cisteína

DM = Diabetes mellitus

DNA = Ácido desoxirribonucleico

EGFR = Receptor del factor de crecimiento epidermal

ERp57 = Proteína disulfuro-isomerasa 3

FLAIR = Fluid attenuated inversion recovery – Recuperación de la inversión atenuada de fluidos

GAPDH = Deshidrogenasa gliceraldehído 3-fosfato

GBM = Glioblastoma multiforme

Gd = Gadolinio

HR = Hazard ratio o cociente de riesgo instantáneo

HTA = Hipertensión arterial

IBA1 = Molécula adaptadora de unión a calcio iónico 1

IDH1/2 = Isocitrato deshidrogenasa 1/2

IRE1 α = enzima requirente de inositol 1 α

KPS= Karnofsky performance status – escala de valoración funcional de Karnofsky

NGS = Next generation sequencing – Secuenciación masiva paralela

NOS: not otherwise specified – Sin otras especificaciones

OMS = Organización mundial de la salud

p-eif2 α = factor iniciador de transducción, fosforilado

P53 = Proteína tumoral 53

pb = pares de bases

PC1/2 = Componente principal 1/2

PCR = Reacción en cadena de la polimerasa

PDI = Proteína disulfuro-isomerasa 1

PER1 = Homólogo de proteína periodo circadiano

PERK = Kinasa de retículo endoplásmico similar a la proteína kinasa R

qRT-PCR = Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa, cuantitativa

QT = Quimioterapia

RE = Retículo endoplásmico

RHOA = Homólogo de la familia Ras, A

RNA = Ácido ribonucleico

RT = Radioterapia

SPARC = Proteína secretada, acídica y rica en cisteína

TCGA = The Cancer Genome Atlas

TERT = Transcriptasa reversa de la telomerasa

TERTp = Promotor de TERT

UPR = Unfolded protein response – respuesta al mal plegamiento de proteínas

VEGF = Factor de crecimiento de endotelio vascular

vWF = Factor de von Willebrand

4 RESUMEN

Introducción. El glioblastoma multiforme (GBM) es la neoplasia primaria maligna más frecuente del sistema nervioso central y se caracteriza por ser un tumor altamente heterogéneo desde el punto de vista histopatológico y molecular. El uso de marcadores moleculares específicos como IDH1/2, promotor de TERT (TERTp) y la amplificación de EGFR permite definir grupos de pacientes con distintos pronósticos clínicos, y constituye un abordaje factible de implementar en la práctica clínica habitual. La respuesta al mal plegamiento de proteínas (UPR) es un blanco terapéutico emergente en distintos tipos de cáncer, sin embargo, se desconoce la relación entre la activación de la UPR y los subtipos moleculares de GBM.

Hipótesis. Los pacientes con mutaciones del promotor de TERT, amplificación de EGFR y sin mutaciones de IDH1/2 presentarán una mayor activación de la vía IRE1 α de la respuesta al mal plegamiento de proteínas, y tendrán un peor desenlace clínico.

Objetivo General. Determinar el perfil de activación de la UPR en distintos grupos moleculares de GBM definidos por las mutaciones de IDH1/2, del promotor de TERT y la amplificación del gen EGFR.

Métodos. Se realizó un estudio observacional analítico, de cohorte, prospectivo en pacientes adultos con diagnóstico confirmado de glioma de alto grado operados en el Instituto de Neurocirugía Asenjo. Los marcadores moleculares de GBM se determinaron mediante secuenciación masiva paralela, y la activación de UPR se determinó a través de la medición de niveles de proteínas y RNA en tejido tumoral.

Resultados. Se reclutaron 39 pacientes con gliomas de alto grado y 5 controles, entre 2018 y 2020, en los que se completó un seguimiento promedio de 15,4 meses. 21 pacientes (64%) presentaron mutaciones de TERTp, 7 pacientes (18%) presentaron mutaciones de IDH y 12 pacientes (35%) tuvieron amplificación de EGFR. La presencia de mutaciones de TERTp y ausencia de mutaciones de IDH se asoció a una mayor expresión de los genes BiP, CHOP y ATF3, los cuales participan en la vía PERK de UPR, y a una mayor expresión de marcadores de invasión tumoral. El desenlace clínico de los pacientes se asoció a la presencia de mutaciones de TERTp e IDH de forma similar a los descrito en la literatura, pero no se asoció a los niveles de activación de UPR, en este estudio.

Conclusión. Nuestros resultados muestran por primera vez una asociación entre mutaciones de TERTp e IDH y la activación de UPR (vía PERK), lo que sugiere que una terapia dirigida a modular esta vía de señalización, podría ser más eficaz en este grupo de pacientes.

5 ABSTRACT

Introduction. Glioblastoma is the most frequent primary brain malignancy. It is a highly heterogeneous tumor, and recent classification systems suggest that molecular markers such as IDH1/2 mutations, TERT promoter mutations, and EGFR amplification can categorize patients in terms of clinical prognosis. On the other hand, the Unfolded Protein Response (UPR) participates in oncogenesis and tumor progression, and it is an emerging therapeutic target in different cancer types including glioblastoma, however, the relationship between molecular markers and UPR activation is poorly understood. **Hypothesis.** Patients harboring TERT promoter mutations, EGFR amplifications and without IDH1/2 mutations will have higher activation of the IRE1 α branch of the UPR, and in turn, will have a worse clinical outcome. **General objective.** To determine the UPR activation profile in GBM patients from different molecular subgroups, as defined by IDH1/2 mutations, TERT promoter mutations, and EGFR amplification. **Methods.** We conducted an observational, prospective cohort study on subjects with confirmed diagnosis of high grade glioma that underwent tumor surgery at the Asenjo Neurosurgery Institute. Genetic markers were determined using targeted - next generation sequencing on an Illumina platform, and UPR activation was assessed at the mRNA and protein levels using fresh-frozen tissue. **Results.** We included 39 patients with high grade gliomas and 5 controls from resective epilepsy surgery, between 2018 and 2020, with a mean follow-up of 15.4 months. We found TERT promoter mutations in 21 patients (64%), IDH1/2 mutations in 7 patients (18%) and EGFR amplification in 12 patients (35%). Patients harboring TERT promoter mutations without IDH1/2 mutations showed higher gene expression levels of BiP, CHOP, and ATF3, all of which are involved in the PERK branch of the UPR, and also higher gene expression levels of tumoral invasion markers. Clinical outcome was associated to TERT promoter and IDH1/2 mutations, similarly to previously reported data, but not to UPR activation, in this study. **Conclusion.** The results of this study are the first to show an association between TERT promoter and IDH1/2 mutations with the activation of the PERK branch of the UPR, suggesting that a therapeutic strategy aimed at modulating this signaling pathway might be more successful in this molecular subgroup of patients.

6 INTRODUCCIÓN

6.1 Glioblastoma Multiforme (GBM) – Generalidades y Clasificación

El GBM es la neoplasia primaria maligna más frecuente del sistema nervioso central (SNC), y corresponde aproximadamente al 48,6% de este tipo de tumores (1). Actualmente es una patología incurable, con una sobrevida media menor a 15 meses pese al mejor tratamiento disponible, que incluye la máxima resección segura posible, radioterapia y quimioterapia concomitante y de mantención por 6 meses (2). El desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para estos pacientes es un importante foco de interés a nivel mundial.

En Chile se estima una incidencia anual para tumores de encéfalo y SNC de 3,5/100.000 personas (3), lo que sería significativamente menor a los datos publicados en EEUU, con aproximadamente 28 casos/100.000 personas, posiblemente asociado a diferencias étnicas y a un subregistro de los casos. A nivel nacional, 2 estudios han descrito grandes series de casos con características clínicas de pacientes con GBM, destacando que la sobrevida de una cohorte con acceso al mejor tratamiento disponible sería similar a lo publicado en la literatura (4), y que existiría un aumento progresivo en el número de casos a nivel nacional, alcanzando más de 30 casos al año en un centro de referencia nacional (5).

El GBM es un astrocitoma de grado 4 en la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS), siendo la entidad más agresiva dentro de este tipo de tumores, y se caracteriza por su alta heterogeneidad histopatológica y molecular, con hiper celularidad, atipias nucleares, alta actividad mitótica, con necrosis y/o proliferación microvascular. El uso de marcadores genéticos en el diagnóstico de GBM se incorporó a la clasificación de la OMS progresivamente desde el año 2016 (6). Actualmente, la 5ta edición de la clasificación de tumores de SNC publicada en

Julio de 2021 (7) separa a los astrocitomas de grado 4 en (i) GBM (IDH-wt) y (ii) astrocitomas grado IV (IDH mutado), y considera por primera vez la presentacia de marcadores moleculares para determinar la gradación tumoral, por lo que tumores previamente considerados de grado 3 podrían ser de grado 4 en presencia de alteraciones genéticas específicas: en el caso de los tumores IDH-wt, las mutaciones del promotor de la transcriptasa reversa de la telomerasa (TERTp), la amplificación del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) y la ganancia de cromosoma 7/pérdida de cromosoma 10; y en el caso de los tumores con mutaciones de IDH, la delección de CDKN2A.

En consideración de los recientes cambios en el sistema de clasificación de tumores de SNC, la capacidad de determinación de las mutaciones previamente descritas en centros de alta resolución terapéutica será de especial relevancia durante los próximos años. En particular, la gradación tumoral dependiente de algunos de estos marcadores permite definir conductas terapéuticas específicas en relación al uso de tratamientos complementarios, como la radioterapia y quimioterapia.

6.2 Mutaciones de IDH1/2

Las mutaciones de IDH ocurren en un 5 a 10% de los astrocitomas grado 4 y se asocian a una menor edad de presentación y a una mayor sobrevida global (8,9). Es así como la sobrevida global de pacientes con astrocitomas grado 4 con mutaciones de IDH puede ser incluso mayor que la de pacientes con astrocitomas grado 3 IDH-wt (10).

Tanto las mutaciones de IDH1 como IDH2 ocurren de forma precoz en la gliomagénesis y se asocian a una ganancia de función que favorece la producción del oncometabolito D-2-hidroxioglutarato (D2HG), y definen un grupo tumoral menos agresivo (11–13).

La mutación más frecuente de IDH es IDH1 R132H, que constituye aproximadamente el 90% de las mutaciones de IDH (14,15). Otras mutaciones menos frecuentes son IDH1 R132C, IDH1 R132S e IDH2 R172K, entre otras (8,15). Actualmente, las mutaciones de IDH son determinadas ampliamente a nivel clínico mediante inmunohistoquímica, la que tiene una especificidad cercana al 100% para R132H, pero no permite detectar otras mutaciones de IDH1 y ninguna de las mutaciones de IDH2 (16).

6.3 Mutaciones de TERTp

Las mutaciones de regiones codificantes de TERT son muy infrecuentes en cáncer, sin embargo, las mutaciones de TERTp se han descrito en el 70-80% de los GBM primarios (17,18), siendo mucho menos frecuentes en astrocitomas con mutaciones de IDH.

La presencia de mutaciones de TERTp es un factor pronóstico independiente de menor supervivencia global en este grupo de pacientes (19,20). Las mutaciones de TERTp ocurren preferentemente en las posiciones chr5, 1295113 C>T y chr5, 1295135 C>T, y se asocian a un aumento de la expresión de TERT (21,22). Actualmente, su determinación en la práctica clínica está limitada a centros con capacidad de realizar secuenciación de DNA.

6.4 Amplificación de EGFR

La amplificación del gen EGFR se observa hasta en 40% de los GBM primarios (23), y constituye una alteración temprana en la génesis tumoral (24). La sobreexpresión de EGFR resulta en una fosforilación persistente y la activación constitutiva del receptor en ausencia de ligandos (25). *In vivo*, la amplificación de EGFR genera un aumento de la actividad del receptor y promueve el crecimiento y la invasión tumoral (26).

Distintos estudios han concluido que la amplificación de EGFR no posee un papel pronóstico independiente en GBM (8,27). Sin embargo, un estudio reciente mostró que la amplificación de EGFR se asoció a una menor supervivencia global y período libre de progresión en un grupo de 96 pacientes sin mutaciones de TERTp (supervivencia global: 13,3 vs 26 meses, $p=0,005$), por lo que distintos autores han propuesto que la evaluación de EGFR podría complementar un sistema de clasificación basado en mutaciones de IDH y TERTp (22,28).

6.5 Medicina Personalizada

La identificación de grupos moleculares en GBM es una oportunidad para el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas basadas en la relación de alteraciones genéticas puntuales con la activación de vías moleculares y la sensibilidad a terapias específicas. Este concepto se conoce como farmacogenómica, y es una de las estrategias más promisorias en tumores altamente heterogéneos como el GBM. Dentro de los posibles blancos para nuevas terapias, una de las vías de señalización que ha ganado atención durante los últimos años es la respuesta al mal plegamiento de proteínas, con múltiples estudios preclínicos sugerentes de un potente efecto antitumoral (29)

6.6 Respuesta al Mal Plegamiento de Proteínas (UPR)

Los tumores de rápido crecimiento están sometidos a condiciones adversas del microambiente como la hipoxia, privación de glucosa y nutrientes, entre otras, que favorecen el desarrollo de mecanismos de adaptación que le otorgan a las células tumorales las características necesarias para la progresión tumoral (30). El control de la homeostasis de proteínas (proteostasis) es un mecanismo emergente involucrado en la adaptación a condiciones adversas del microambiente tumoral y en la progresión tumoral (31). Por otra parte, la alta demanda de síntesis proteica,

aumento de secreción o activación de oncogenes, pueden alterar el funcionamiento del retículo endoplásmico (RE), llevando a la acumulación de proteínas mal plegadas dentro del RE y generando una condición de estrés celular conocida como estrés de RE.

Bajo condiciones de estrés de RE, las células activan una vía de señalización integrada conocida como respuesta al mal plegamiento de proteínas (Unfolded Protein Response, UPR), regulando la vía secretora en múltiples niveles (32). La participación de UPR en cáncer fue propuesta inicialmente en 2004, y actualmente es ampliamente aceptada (33,34). Además de participar como un mecanismo adaptativo, se ha descrito la importancia de la UPR en la transformación maligna, el potencial metastásico, la regulación de la dormancia celular, estabilidad genómica, angiogénesis y metabolismo celular (34,35). Las características propias de las células tumorales, como la aneuploidía, el aumento de la demanda metabólica y las altas tasas de proliferación requieren de una maquinaria secretora particularmente robusta, y este aumento en la demanda secretora sería responsable de una activación basal de la UPR en cáncer (36).

6.7 Vías de Señalización de UPR

En mamíferos, la UPR consiste en al menos 3 vías de señalización paralelas que son iniciadas por la activación de distintos sensores de estrés de RE: la enzima requirente de inositol-1 α (IRE1 α), la proteína quinasa de RE similar a PRK (PERK) y el factor de transcripción activador 6 (ATF6) (37). En ausencia de estrés de RE, la chaperona BiP/GRP78 se encuentra asociada al dominio luminal de los 3 sensores IRE1 α , PERK y ATF6, impidiendo su activación. En respuesta al estrés de RE, BiP/GRP78 une preferentemente proteínas mal plegadas, permitiendo la activación de los distintos sensores (38,39).

IRE1 α es una proteína transmembrana tipo I con actividad quinasa y endoribonucleasa (ARNasa) (40). IRE1 α cataliza la escisión de un intrón de 26 nucleótidos del mRNA del factor de transcripción XBP1 (X-box Binding Protein 1), modificando el marco de lectura, traduciéndose en una forma más estable y activa de este factor de transcripción, llamada XBP1s. XBP1s regula genes involucrados en el plegamiento de proteínas, en la degradación de proteínas asociada a RE (ERAD) y en la degradación regulada de mRNA dependiente de IRE1 (41).

Por su parte, la activación de PERK fosforila el factor de transducción eIF2A (eukaryotic translation initiation factor 2A), inhibiendo el proceso de síntesis proteica de forma global, reduciendo la sobrecarga de proteínas en el RE (42), y favoreciendo la traducción selectiva del factor de transcripción ATF4 (43). ATF4 es fundamental en la respuesta proapoptótica, mediante el aumento de la transcripción de CHOP (43). La activación de la vía PERK está estrechamente relacionada a la expresión de ATF3, la que aumenta en relación a la fosforilación de PERK, y que a su vez favorece la transcripción de PERK y CHOP, además de participar en la activación de distintas vías de muerte celular (44,45).

6.8 UPR en GBM

El grupo de nuestro colaborador en Francia, el Dr. Eric Chevet, ha sido pionero en definir el rol de la UPR en GBM, siendo los primeros en demostrar que la expresión de un dominante negativo de IRE1 α en células U87 inhibe la angiogénesis y disminuye el crecimiento tumoral (46). Posteriormente, se determinó de forma retrospectiva una correlación negativa de los niveles de XBP1s en tejido tumoral y la sobrevida global de los pacientes (47). Recientemente, este grupo categorizó a los pacientes con GBM en alta y baja activación de las vías de XBP1s y RIDD, observando distintas curvas de sobrevida y distintos niveles de expresión de genes

asociados a respuesta inflamatoria/inmune (IBA1, CD14), angiogénesis (vWF, CD31) e invasión tumoral (RHOA, Cyr61) para cada grupo. Estos resultados sugieren que la determinación del estatus de activación de la UPR en pacientes con GBM puede tener un importante valor pronóstico en GBM (48).

Distintos estudios han mostrado una expresión elevada de BiP/GRP78 en pacientes con GBM (49,50). Adicionalmente, se ha demostrado una mayor activación de la vía PERK en gliomas de alto grado versus tejido cerebral normal (51). En el mismo estudio, se demostró que el silenciamiento de PERK *in vivo* disminuyó la capacidad de formación de tumores en un modelo de xenoinplante tumoral subcutáneo. En un estudio reciente, se demostró que la activación de PERK es mayor en células madre tumorales en comparación a células de GBM diferenciadas, lo que podría asociarse particularmente a la aparición de recidivas tumorales, y además se observó que una mayor activación de la vía PERK, evaluada por inmunohistoquímica, se asoció a una menor sobrevida global en una cohorte de 148 pacientes con GBM (52).

Otras proteínas chaperonas que participan en la respuesta al estrés de RE se han asociado a la progresión tumoral y a peores desenlaces clínicos en pacientes con GBM, dentro de las que destaca la familia de las proteínas disulfuro-isomerasas (PDI, ERp57) (53,54), las que además han sido blanco terapéutico de moléculas pequeñas con efecto radiosensibilizador en modelos *in vivo* de GBM (55).

Un análisis proteómico de distintas líneas celulares de GBM, evidenció la activación de diferentes vías de señalización molecular en respuesta a la inducción de estrés de RE y activación de la UPR, lo que sugiere una respuesta celular heterogénea, dependiente del tipo

celular y posiblemente asociado a distintos marcadores moleculares presentes en cada línea tumoral (56).

En la medida que se ha caracterizado mejor el papel de la activación de UPR en cáncer, y las proteínas que participan en las distintas vías de señalización, se ha reconocido progresivamente el valor del beneficio clínico que podría tener la modulación selectiva de UPR. Actualmente, existen distintas alternativas terapéuticas en desarrollo, en su mayoría en etapas preclínicas, y una adecuada selección de pacientes podría facilitar el avance de estas terapias hacia estudios clínicos (29).

6.9 UPR y Marcadores Genéticos

Existe escasa información sobre la relación entre marcadores genéticos de GBM y activación de vías de UPR. Se ha descrito que pacientes con un perfil de expresión génica proneural (con una alta frecuencia de mutaciones de IDH) presentan menores niveles de activación de UPR en comparación con los grupos proliferativo y mesenquimal (49), mientras que en otro estudio, el subtipo mesenquimal (alta frecuencia de mutaciones de TERTp y amplificación de EGFR) se asoció a una mayor actividad IRE1 (48). Recientemente, se publicó el análisis de expresión génica de genes blanco de UPR en la cohorte del TCGA, mostró una mayor activación de UPR en el grupo IDHwt y subtipo mesenquimal, lo que es concordante con estudios previos (57).

En suma, la determinación de marcadores genéticos de GBM tiene un valor clínico fundamental, en vista de los nuevos sistemas de clasificación tumoral, por lo que su implementación es de gran relevancia en la práctica clínica. Más aún, la caracterización de la activación de UPR en cada grupo molecular definido según la presencia de mutaciones de IDH1/2, TERTp y la amplificación de EGFR, permitirá identificar los subgrupos de pacientes que se beneficiarían

con mayor probabilidad de una intervención dirigida a modular este mecanismo de respuesta celular, y favorecerá el enfoque traslacional de futuras investigaciones en esta área. En particular, la identificación de un grupo de pacientes con mayor activación de vías específicas de la UPR podría favorecer el avance de las múltiples estrategias preclínicas de modulación que existen actualmente, a fases clínicas, con mayor probabilidad de éxito.

7 HIPÓTESIS

Los pacientes con mutaciones del promotor de TERT, con amplificación de EGFR y sin mutaciones de IDH1/2 presentarán una mayor activación de la vía IRE1 α de la respuesta al mal plegamiento de proteínas, asociado a un peor desenlace clínico.

8 OBJETIVOS

8.1 Objetivo General:

Determinar el perfil de activación de UPR en distintos grupos moleculares de GBM definidos por las mutaciones de IDH1/2, del promotor de TERT y la amplificación del gen EGFR.

8.2 Objetivos Específicos:

- 1) Definir grupos moleculares de GBM de acuerdo a la presencia de mutaciones de IDH1/2, del promotor de TERT y de la amplificación del gen de EGFR en tejido tumoral de pacientes con GBM.
- 2) Caracterizar el perfil de activación de UPR en tejido tumoral de GBM.
- 3) Asociar el perfil de activación de UPR con el desenlace clínico de los pacientes y con los distintos grupos moleculares de GBM

9 MÉTODOS

9.1 Reclutamiento y selección de pacientes

Se realizó un estudio observacional analítico, de cohorte, prospectivo, en el que se incluyeron 39 pacientes mayores de 18 años con diagnóstico presuntivo de glioma de alto grado mediante Resonancia Magnética (RM) cerebral, posteriormente confirmado mediante diagnóstico histopatológico. Se incluyeron pacientes sometidos a cirugía de resección total o parcial en el Instituto de Neurocirugía Asenjo, entre enero de 2018 y enero de 2020. Adicionalmente, se incluyeron en el estudio 5 pacientes a los que se realizó una lobectomía temporal anterior para el tratamiento de epilepsia, los que fueron utilizados en el análisis como control de tejido no tumoral. Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado previo a la cirugía (**Anexo N°1**), el cual fue aprobado por los comités de ética científica del Servicio de Salud Metropolitano Oriente (**Anexo N°2**) y de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (**Anexo N°3**).

Se excluyeron pacientes que hubiesen recibido tratamientos complementarios para el tratamiento del tumor (quimioterapia o radioterapia) previo a la cirugía; aquellos con muestra insuficiente de tejido tumoral para el estudio molecular y pacientes con síndromes de neoplasias hereditarias (neurofibromatosis tipo I, Li-Fraumeni, etc.). No se utilizaron otros criterios de exclusión.

9.2 Seguimiento clínico e imagenológico

Durante evaluaciones clínicas preoperatorias y de seguimiento (30 días postoperatorio y 12 semanas post-radioterapia), se recolectó información clínica (características demográficas, síntomas, examen neurológico, uso de medicamentos, Karnofsky Performance Status (KPS)

preoperatorio y postoperatorio, entre otros) utilizando pautas de evaluación estandarizadas (ver **Anexo N°4A y 4B**).

La progresión tumoral se determinó de forma clínica e imagenológica, utilizando los criterios del grupo de trabajo “Response Assessment in Neuro-Oncology” (RANO) (58) (ver **Anexo N°5**). El seguimiento imagenológico se realizó con una RM de cerebro postoperatoria inmediata (<72h) en todos los pacientes en los que fue posible, además de RM de seguimiento tardío según indicación por su médico tratante o indicadas en las evaluaciones de seguimiento del estudio. En todas las RM se realizaron al menos las siguientes secuencias: T1W axial y sagital pre y post inyección de gadolinio (Gd), T2-FLAIR axial, DWI axial. Las RM disponibles fueron analizadas para volúmenes tumorales de captación de Gd y áreas hiperintensas en FLAIR mediante segmentación manual en el plano axial para cada corte en el que se observó tumor, utilizando el software gratuito Horos (v4.0.0). Estas mediciones fueron realizadas por un neurocirujano e investigador principal de este estudio, ciego a las demás variables del estudio al momento del análisis. Se presentan imágenes representativas de la segmentación manual realizada, en la **Figura 1**.

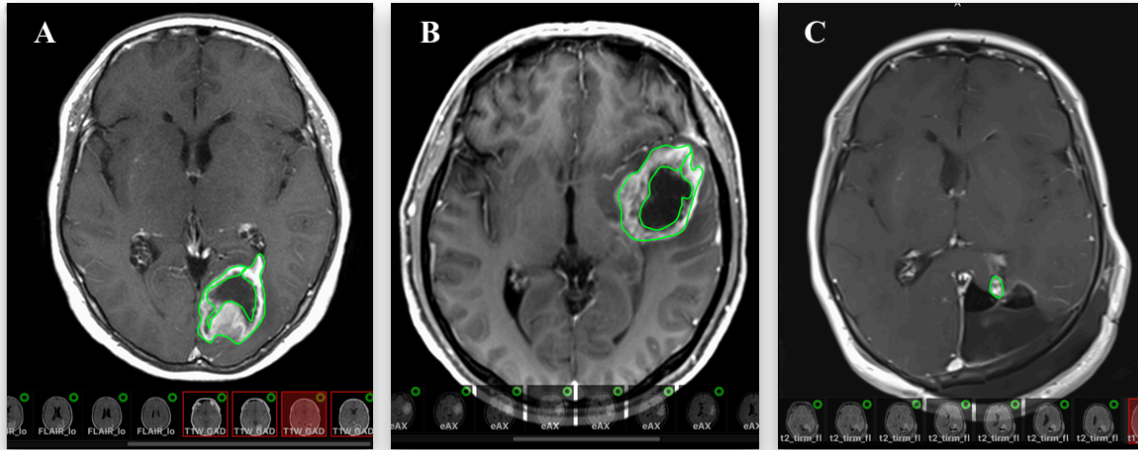


Figura 1. *Imágenes representativas de segmentación manual de áreas de captación de contraste en Resonancia Magnética (RM). Se realizó una segmentación manual de las RM de pacientes con gliomas de alto grado, utilizando el programa Horos (v4.0.0). A y B muestran secuencias T1-Gadolinio de RM preoperatorias con patrón de captación de contraste en anillo (pacientes GBM-03 y GBM-12, respectivamente). C muestra una captación de contraste residual en RM postoperatoria inmediata (paciente GBM-03).*

9.3 Obtención y manejo de muestras intraoperatorias

Se obtuvieron muestras de tejido fresco en el intraoperatorio (3-5g de tejido por paciente), que se transportaron al Laboratorio de Control de Proteostasis y Biomedicina del Instituto de Neurociencia Biomédica de la Universidad de Chile. Durante el transcurso del estudio, 22 de las 44 muestras (total, incluyendo tejido tumoral y controles) se transportaron en hielo y fueron congeladas a -80°C en menos de 2h. Las 22 muestras restantes fueron congeladas en criotubos utilizando medio de congelación OCT (por sus siglas en inglés: *optimal cutting temperature*) y hielo seco en el pabellón, inmediatamente posterior a su recolección. Las muestras procesadas de esta forma fueron utilizadas posteriormente para la determinación de activación de UPR a

nivel de mRNA y proteínas. Para la extracción de DNA se utilizaron muestras de los mismos pacientes, posterior a su fijación en formalina e inclusión en parafina, y fueron obtenidas desde el Servicio de Anatomía Patológica del Instituto de Neurocirugía Asenjo. El manejo de las muestras durante las distintas etapas de trabajo se realizó utilizando datos codificados para mantener la privacidad del paciente. Se utilizará un código incluyendo el número correlativo del paciente ingresado al estudio, mes y año de obtención de la muestra. Se presenta un esquema del flujograma de trabajo en la **Figura 2**.

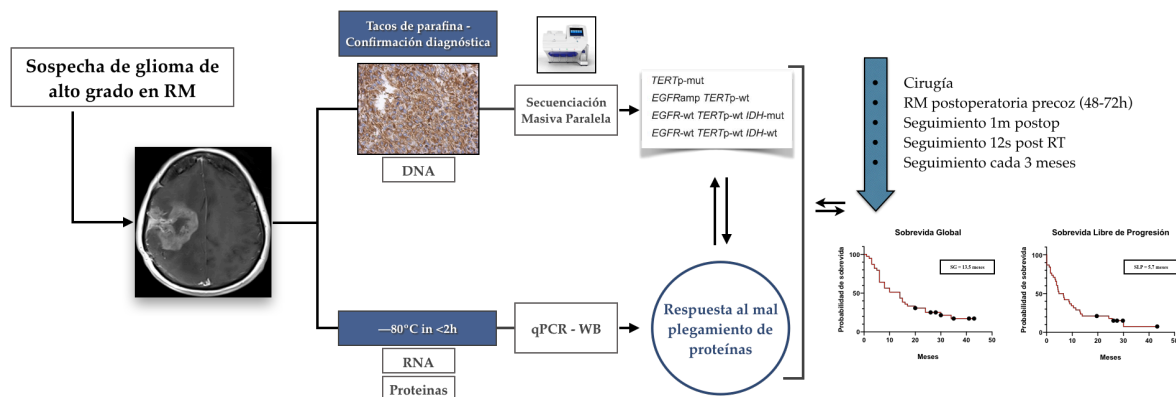


Figura 2. Representación esquemática del protocolo de trabajo. Se incluyeron pacientes con sospecha de un glioma de alto grado mediante RM; se utilizó tejido procesado desde tacos de parafina para confirmar el diagnóstico histopatológico y determinar los marcadores genéticos; se utilizó tejido fresco congelado a -80°C en $<2\text{h}$ para la determinación de activación de respuesta al mal plegamiento de proteínas (UPR) (expresión génica y niveles proteicos); se realizó un seguimiento clínico e imagenológico de cada paciente para determinar desenlaces clínicos. Finalmente, se analizó la relación entre marcadores genéticos, activación de UPR y desenlaces clínicos entre sí. RM = Resonancia Magnética. SG = Sobrevida global. SLP = Sobrevida libre de progresión. WB = Western blot.

9.4 Secuenciación masiva paralela (NGS) y análisis bioinformático

9.4.1 Diseño de paneles de secuenciación

Se utilizó la herramienta Ampliseq™ para Illumina para generar un panel personalizado de amplicones con cobertura sobre las áreas de interés del genoma. Se utilizaron las bases de datos cbiportal, NCBI/Clinvar y COSMIC para determinar la relevancia y coordenadas genómicas de las mutaciones en los genes de interés reportadas para tumores gliales, y se diseñaron amplicones que incluyeron dichas mutaciones (**Tabla suplementaria 5**). En términos de frecuencia, se consideraron relevantes las mutaciones con más de 10 reportes en la literatura. Esta estrategia de secuenciación (ES1) incluyó 339 amplicones de 134pb promedio (rango de 125 a 140pb), con cobertura sobre 15596pb. Del total de amplicones en ES1, 7 fueron diseñados para cubrir IDH1 (391pb), 5 para IDH2 (256pb) y 131 para EGFR (7872pb), los que serán considerados en los análisis de esta tesis doctoral; el resto de los amplicones se utilizaron como referencia para el cálculo de número de copias de EGFR y serán considerados para futuros análisis de esta cohorte de pacientes.

Debido a que la región promotora del gen TERT es una región con alto porcentaje de bases GC, fue necesario diseñar una estrategia de secuenciación complementaria (ES2) basada en la generación de amplicones individuales, que fueron posteriormente secuenciados. Esta estrategia de secuenciación incluyó 25 amplicones de 230pb promedio (rango de 192 a 266pb), con cobertura sobre 5750pb. Del total de amplicones en ES2, 1 amplicón fue diseñado para cubrir la región promotora de TERT (incluyendo ambas mutaciones descritas en tumores gliales), 1 para IDH1 y 1 para IDH2, los que serán considerados en los análisis de esta tesis doctoral, el

resto de los amplicones diseñados cubrieron genes de interés que se utilizarán para futuros estudios.

Para disminuir la ocurrencia de falsos negativos de secuenciación, se planificó una profundidad de cobertura mayor a 250 lecturas por posición de interés, con el objetivo de detectar frecuencias alélicas de hasta un 5%, con un umbral de número de lecturas alteradas ≥ 5 , de acuerdo a las recomendaciones de la literatura (59).

9.4.2 Extracción de DNA

Se utilizaron muestras de tejido fijado en formalina e incluido en parafina obtenidas desde el Servicio de Anatomía Patológica del Instituto de Neurocirugía Asenjo. Previa confirmación por una neuropatóloga de un porcentaje tumoral $>70\%$ en cada una de las áreas a extraer, se realizaron 3-6 cortes de 10 micras por cada taco de parafina. Estas muestras fueron sometidas a un proceso de desparafinación y extracción de DNA, utilizando el kit GeneJET FFPE DNA Purification Kit (#K0881), según instrucciones del fabricante. Brevemente, se realizó una desparafinación y digestión enzimática secuencial de las muestras con un buffer de digestión, proteinasa K y RNAsa A, seguido de una purificación con columnas y elución en 30uL de buffer de elución.

El DNA extraído de esta forma, fue cuantificado utilizando métodos de fluorescencia (Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA y/o Qubit™ dsDNA HS), obteniéndose concentraciones promedio de 40ng/uL. No se realizó un control de calidad cualitativo luego de la extracción de DNA, de acuerdo a las recomendaciones de Illumina para la preparación de librerías.

9.4.3 Preparación de librerías

El proceso de preparación de librerías y la secuenciación masiva paralela se realizó en el Centro de Genómica y Bioinformática de la Universidad Mayor. Para la preparación de librerías de la ES1, se utilizó el kit de Ampliseq™ for Illumina Custom DNA Panel y los adaptadores Ampliseq CD for Illumina. Para la preparación de librerías de la ES2, se utilizó el kit de Truseq nano DNA de Illumina y los adaptadores Truseq DNA CD for Illumina. Adicionalmente, previo a la preparación de librerías con el kit Truseq, se generaron amplicones mediante PCR convencional del promotor de TERT y las áreas de interés de IDH1 e IDH2. Se evaluaron los partidores descritos en la **Tabla 1**, y en la **Figura 3** se presentan los geles de agarosa al 2% de los pares de partidores en los que se logró una adecuada amplificación. Los partidores utilizados fueron IDH1 #1, IDH2 #1 y TERTp #3, y se utilizaron a una concentración final de 200nM + 3% DMSO, utilizando 30 ciclos de amplificación y temperaturas de annealing 2°C bajo la T_m calculada.

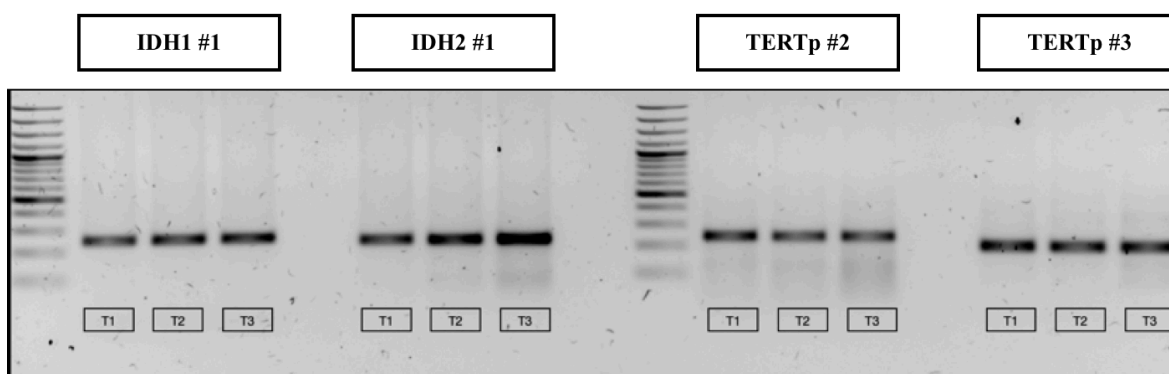


Figura 3. Amplificación de IDH1, IDH2 y promotor de TERT para generación de librerías Truseq nano DNA. A partir de cada muestra de GBM, se generaron amplicones en las áreas de interés de los genes IDH1, IDH2 y TERTp, utilizando los partidores IDH1 #1, IDH2 #1, TERTp #2, y TERTp #3, descritos en la Tabla 1. Se realizó un PCR con desnaturalización de 5 minutos

a 95°C, 30 ciclos de amplificación y 10 minutos de elongación. Se evaluaron las temperaturas de anillamiento T1, T2 y T3, correspondientes a 2°C bajo la temperatura de fusión (Tm), la Tm, y 2°C por sobre la Tm, respectivamente. Se presentan los resultados para una muestra de GBM en un gel de agarosa al 3%, utilizando los partidores IDH1 set #1, IDH set #2, TERTp set #2 y TERTp set#3.

ID	Secuencia	Largo	Tm	Tamaño amplicón	Región cubierta
IDH1 #1 Forward	GCC AAC ATG ACT TAC TTG ATC CC	23	55,9	222	Chr2:208248354-208248575
IDH1 #1 Reverse	GGC GTC AAA TGT GCC ACT ATC	21	56,6		
IDH1 #2 Forward	CGG TCT TCA GAG AAG CCA TT	20	54,7	219	Chr2:208248248-208248466
IDH1 #2 Reverse	TTC ATA CCT TGC TTA ATG GGT GT	23	54,4		
IDH2 #1 Forward	GTC AGT GGA TCC CCT CTC CA	20	58,3	245	Chr15:90088556-90088800
IDH2 #1 Reverse	CTG GTT GAA AGA TGG CGG CT	20	58,2		
IDH2 #2 Forward	CCG GTC TGC CAC AAA GTC T	19	57,6	203	Chr15:90088473-90088675
IDH2 #2 Reverse	GGG AGC CCA TCA TCT GCA A	19	57,7		
TERTp #1 Forward	CAG CGC TGC CTG AAA CTC	18	56,9	235	Chr5:1295036-1295270
TERTp #1 Reverse	AGT GGA TTC GCG GGC ACA GA	20	61,7		
TERTp #2 Forward	AGC GCT GCC TGA AAC TCG	18	58,5	242	Chr5:1295037-1295278
TERTp #2 Reverse	GGG CTC CCA GTG GAT TCG	18	58,3		
TERTp #3 Forward	GGGCCAGGGCTTCCCA	16	59,2	195	Chr5:1295004-1295198
TERTp #3 Reverse	GTCTGCCCCCTTACCTTC	19	58,7		

Tabla 1. Secuencias de partidores evaluadas en la amplificación de regiones de interés de los genes IDH1, IDH2 y TERTp.

Tanto para las librerías de Ampliseq™ como Truseq™ se evaluó la eficacia de la generación de librerías con distintas cantidades iniciales de DNA y se siguieron las recomendaciones de Illumina para ajustar las distintas etapas del proceso de acuerdo con las características específicas de las muestras y del panel. Un esquema del protocolo utilizado a partir de 10ng de DNA por paciente para Ampliseq y 100ng de DNA por paciente para Truseq, se presentan en las **Tablas Suplementarias 1 y 2**, respectivamente. Durante la estandarización de la generación de librerías, se realizaron electroforesis automatizadas de las primeras librerías para control de

calidad y para estimación del tamaño de las mismas, utilizando el kit DNA 1000 en el equipo Agilent 2100 Bioanalyzer. Se presentan algunos electroferogramas obtenidos, a modo de ejemplo, en la **Figura 4**. Todas las librerías fueron cuantificadas mediante qPCR utilizando el kit de cuantificación de librerías KAPA de Illumina, y se agruparon a una concentración de 10nM previo a la secuenciación.

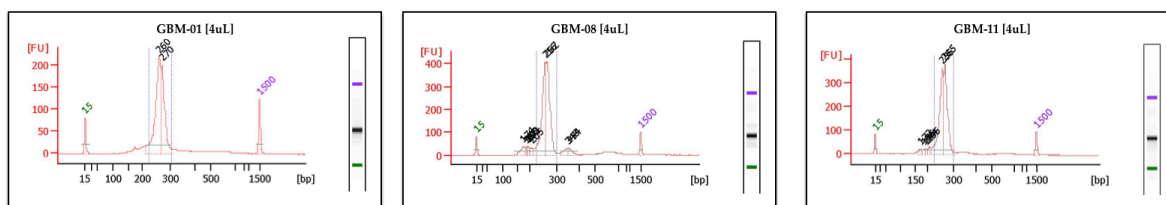


Figura 4. Electroferogramas representativos de librerías Ampliseq. Se realizó un control de calidad de las librerías de Ampliseq generadas con el protocolo descrito en la Tabla Suplementaria 1, previo a la secuenciación. Se presentan electroferogramas representativos de 3 librerías de GBM (GBM-01, GBM-08 y GBM-11) generadas mediante el kit de preparación de Ampliseq. Se utilizó el kit DNA1000 para detección de librerías, mediante la plataforma Agilent 2100 Bioanalyzer; se cargaron 4uL por pocillo. Se observan picos de fluorescencia bien delimitados, con tamaños de librería de acuerdo a lo esperado, con aproximadamente 260pb. FU = Unidades de fluorescencia.

9.4.4 Secuenciación Masiva Paralela (NGS)

Para la secuenciación de la ES1 se utilizó inicialmente un Micro Kit v2 (300 ciclos) en un secuenciador MiSeq de Illumina, en el que se incluyeron 10 librerías para evaluar los requerimientos de phi-x y la concentración de carga en el secuenciador. Posteriormente, se utilizó un Mid Output Kit v2.5 (150 ciclos) en un secuenciador NextSeq con 25% de phi-X para

el total de las muestras. Para la secuenciación de la ES2 se utilizó directamente un Micro Kit v2 (300 ciclos) con 25% de phi-X en un secuenciador MiSeq para todas las muestras.

9.4.5 Análisis bioinformático

A partir de la secuenciación, se generaron archivos .fastQ que fueron analizados con el software fastQC para control de calidad (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Se removieron reads de baja calidad y contaminación de adaptadores utilizando la herramienta trim_galore (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore). Se determinó la calidad de secuenciación utilizando la escala Q, que representa la probabilidad estimada de informar una base incorrecta. Para una probabilidad de error P, $P = 10^{-Q/10}$, por lo que el indicador Q20 se asocia a un $P = 0,01$, y el indicador Q30 se asocia a un $P=0,001$.

Los reads procesados se alinearon al genoma de referencia versión GRCh38 utilizando la herramienta Bowtie2 (60). En esta estrategia de secuenciación no se realiza la eliminación de duplicados, ya que ambos protocolos de generación de librerías utilizados consideran una etapa de enriquecimiento inicial de amplicones. Los resultados alineados *.sam fueron convertidos a archivos *.bam utilizando la aplicación samtools para almacenamiento y posterior análisis. El llamado de variantes se realizó con bcftools (61), filtrando por calidad de secuenciación y regiones de interés para cada panel estudiado, y fueron informados en un archivo *.vcf standard. Dado que en este estudio sólo evaluamos variantes previamente reportadas en la literatura con un promedio de frecuencias alélicas mayor al 30%, definimos un mínimo de 100 lecturas por posición o un mínimo de 15 lecturas de una variante para considerar los resultados con una profundidad de secuenciación adecuada. Además, se utilizó el visor Integrative Genomics Viewer (IGV 2.10) para identificar y corregir posibles errores en el alineamiento. La

calidad de secuenciación se determinó utilizando la escala Q, que representa la probabilidad estimada de un error.

La determinación de cambios en número de copias de un gen mediante secuenciación de amplicones posee limitaciones intrínsecas a esta estrategia de secuenciación, principalmente asociadas a la heterogeneidad de cobertura en las distintas regiones de interés (62). El análisis de número de copias de EGFR se realizó mediante el paquete de R CNVPanelizer (63), que emplea una normalización del número de lecturas del gen de interés en base al número de lecturas totales de cada muestra, utilizando posteriormente un algoritmo de remuestreo (bootstrapping con reemplazo, $n=10.000$), lo que permite disminuir el efecto de la heterogeneidad de cobertura en la interpretación de los datos. Se determinó la razón de cambio de EGFR en relación a 3 muestras control, utilizando información de cobertura sobre 136 amplicones del gen EGFR y 177 amplicones fuera de la región de interés (genes ATRX, NF1, BRAF, PTEN y CDKN2A). La significancia estadística de los resultados se evaluó mediante la prueba de Bonferroni.

El tipo y la frecuencia de las mutaciones, la cobertura de secuenciación para cada gen de interés y algunas características clínicas, se presentan de forma gráfica utilizando la herramienta web para genómica en cáncer de cBioportal (64,65)

9.5 Extracción de RNA y proteínas

La extracción de RNA desde tejido se realizó utilizando el kit RibospinTM GeneAll[®], de acuerdo con las instrucciones del fabricante, a partir de 100mg de tejido tumoral homogeneizado de cada paciente. El RNA se cuantificó utilizando un espectrofotómetro para microplacas EPOCHTM de BioTek, y se analizaron relaciones de absorbancia 260/280 y 230/260, con referencias en

320nm. La cuantificación de proteínas se realizó utilizando el método de ácido bicinonínico (BCA), a partir de 100mg de tejido tumoral homogeneizado, sonificado y tratado con NP40 e inhibidores de proteasas y fosfatasa, diluido en buffer TEN.

9.6 qRT-PCR

Se sintetizó cDNA a partir de 200ng de RNA para cada muestra, utilizando el kit de transcriptasa reversa GoScript™ de Promega. Se utilizaron diluciones 1:10 de cDNA para cada qRT-PCR, y Evagreen para la detección de señal de amplificación en un equipo Agilent Mx3000, con el software MxPro qPCR. Se utilizó un método de normalización doble delta CT con 2 genes constitutivos (GAPDH y Actina), de acuerdo con lo propuesto en la literatura para el estudio de expresión génica en cáncer (66–68). Se utilizaron los siguientes primers para determinación de marcadores de UPR y otras vías de señalización.

ID	Forward	Reverse
hActina	GCGAGAAGATGACCCAGATC	CCAGTGGTACGGCCAGAGG
hATF3	TAGGCTGGAAGAGCCAAAGA	TTCTCACAGCTGCAAACACC
hBiP	AACTGGATCCCAACACCAAA	AGGTGGTCCACGGTAGTGAG
hCD14	ACGCCAGAACCTTGTGAGC	GCATGGATCTCCACCTCTACTG
hCD31	AACAGTGTTGACATGAAGAGCC	TGTAAACAGCACGTCATCCTT
hCD34	AATCAGCACAGTGTTACCAC	TGCCCTGAGTCAATTTCACTTC
hCHOP	ATTGACCGAATGGTGAATCTGC	AGCTGAGACCTTTCCTTTTGTCTA
hCyr61	GGTCAAAGTTACCGGGCAGT	GGAGGCATCGAATCCCAGC
hGAPDH	AAGGTGAAGGTCGGAGTCAA	CATGGGTGGAATCATATTGG
hIBA1	ATGAGCCAAACCAGGGATTTAC	GGGATCGTCTAGGAATTGCTTGT
hPER1	ACGGGCCGAATCGTCTACA	TGGAACCATAGAAGACTCCAC
hRHOA	AGCCTGTGGAAAGACATGCTT	TCAAACACTGTGGGCACATAC
hSPARC	GGCCTGGATCTTCTTTCTCC	CCACCACCTCTGTCTCATCA
h ν WF	CCGATGCAGCCTTTTCGGA	TCCCCAAGATACACGGAGAGG
hXBP1s	TGCTGAGTCCGCAGCAGGTG	GCTGGCAGGCTCTGGGAAAG

Tabla 2. Secuencias de partidores utilizadas para qRT-PCR de marcadores de UPR y otros procesos de cáncer.

9.7 Western blot

Se cargaron 45-60 μ g de proteínas totales en geles al 10% SDS-PAGE que luego fueron transferidos a membranas PVDF. Las membranas fueron bloqueada con leche o BSA al 5% en PBS 0,1% - Tween20 por 60 minutos a temperatura ambiente e incubada con anticuerpos primarios (anti BiP, eif2-alfa total, phospho-eif2-alfa, ERp57 y PDI) durante 16h a 4°C. Los anticuerpos primarios fueron detectados con anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa mediante detección de ECL y la cuantificación de señal se realizó mediante el programa Image Lab (v6.0.1). La comparación entre distintos experimentos se realizó mediante la determinación

de una razón de carga en relación a muestras de tejido control en cada membrana, utilizando actina como referencia.

Proteína	Dilución	Marca (N° Catálogo)
Actina	1:1000	Santa Cruz (SC-8432)
BiP	1:2000	Abcam (ab21685)
eIF2 α Total	1:500	Santa Cruz (SC-11386)
ERp57	1:1000	Abcam (ab13506)
PDI	1:1000	Abcam (ab2792)
p-eIF2 α	1:1000	Cell Signaling (3398S)

Tabla 3. Anticuerpos utilizados para Western blot de marcadores de UPR.

9.8 Variables de Estudio y Análisis Estadístico

El cálculo de tamaño muestral se realizó utilizando la función de estimación de tamaño muestral para comparación de medias de STATA (v15.0) considerando los datos de activación de UPR en los grupos moleculares descritos por Verhaak (23) disponibles públicamente en <https://cancergenome.nih.gov>. Considerando la menor magnitud del efecto clínicamente relevante en la sobrevida global de los pacientes (49) se planteó un tamaño muestral capaz de detectar una diferencia del 50% de expresión de GRP78/BiP entre los grupos de mayor y menor activación de UPR. De esta forma, para una potencia del 80% y un nivel de significancia del 5%, se determinó que el grupo de menor representación debería tener al menos 4 pacientes. Dado que la frecuencia del grupo menos representado en la literatura es de aproximadamente un 10% de la población (definido por las mutaciones de IDH1/2), se estableció un tamaño muestral de 40 pacientes.

El desenlace clínico de los pacientes se evaluó mediante la sobrevida global y sobrevida libre de progresión. La sobrevida libre de progresión se definió como el tiempo en meses desde el

momento de la primera cirugía de resección tumoral hasta la detección de progresión clínica o imagenológica. El tiempo de supervivencia global se definió como el tiempo en meses desde el momento de la primera cirugía de resección tumoral hasta el fallecimiento del paciente por cualquier causa. Ambas variables son variables cuantitativas continuas, y el cierre del estudio se definió al 18 de agosto de 2021. Las diferencias entre curvas de supervivencia se evaluaron utilizando la prueba de log-rank (Mantel-Cox).

Se determinaron medidas de tendencia central y dispersión de cada variable según sus características. Las variables de activación de UPR presentaron una distribución no normal, por lo que se realizaron transformaciones tipo z-score de cada variable, para facilitar su comparación entre sí, utilizando la siguiente fórmula $z = (x - \mu) / \sigma$ (x = valor original, μ = media, σ = desviación standard). El análisis inicial de las distintas variables consideró regresiones multivariable de posibles variables de confusión en la activación de UPR, análisis de componentes principales (PCA, utilizando matrices de correlación y valores propios >1) y análisis de clústers jerárquicos (utilizando parámetros habituales de jerarquización en análisis de expresión génica: distancias Euclidianas y método de Ward). Para el análisis de clúster jerárquicos se utilizó la herramienta web Next-Generation Cluster Heat Map Builder del departamento de informática del centro MD Anderson (69). En el análisis de clústers jerárquicos, además se realizó una transformación logarítmica de las variables para facilitar la agrupación entre distintos pacientes. Para analizar el efecto de variables externas sobre la variabilidad de los marcadores de UPR, se realizaron regresiones lineales uni y multivariable. Las diferencias entre niveles de activación de UPR entre los distintos grupos se determinaron mediante t-test ajustados por igualdad de varianza de una cola (al comparar grupos genéticos) o 2 colas (comparación por variables clínicas y por grupos de activación de UPR) en el caso de comparación de 2 grupos, o por modelos de

regresión heterocedásticos de dos colas en el caso de comparación de múltiples grupos. Se evaluó la relación entre los marcadores genéticos y los distintos marcadores de activación de UPR con el desenlace clínico, mediante regresión de Cox. Se retuvieron para el modelo multivariable aquellas variables con $p < 0,25$ en el análisis univariado, y posteriormente se incluyeron factores pronósticos conocidos: Karnofsky performance status (KPS) postoperatorio, edad al diagnóstico, grado de resección tumoral y tratamientos complementarios), utilizando un método paso a paso (stepwise). Se consideró significativo un valor $p < 0,05$, pero los valores p entre 0,05 y 0,1 también se analizaron y se comentan.

9.9 Consideraciones Éticas

Se obtuvo un consentimiento informado de todos los pacientes participantes antes de cualquier intervención contemplada en el estudio. Se utilizó un consentimiento informado específico para el grupo de pacientes control (ver **Anexo N°1B**). Se obtuvo la aprobación del comité de ética científica del Servicio de Salud Metropolitano Oriente con fecha 10 de octubre de 2017. Posteriormente, se obtuvo la aprobación de la dirección del Instituto de Neurocirugía Asenjo con fecha 4 de diciembre de 2017. Finalmente, se obtuvo la aprobación del comité de ética de investigación de la Facultad de Medicina con fecha 23 de enero de 2018 (proyecto N°182-2017).

10 RESULTADOS

10.1 Pacientes

El reclutamiento de pacientes se inició en enero de 2018 y se completó en enero de 2020 con 39 pacientes con gliomas de alto grado y 5 pacientes control. Se incluyeron en el estudio 34 pacientes con diagnóstico de GBM (grado IV de la OMS) y 5 pacientes con diagnóstico de astrocitoma anaplásico (grado III de la OMS). En la **Tabla 4** se presentan las variables clínicas y demográficas más relevantes de todos los pacientes con gliomas de alto grado. En la **Tabla Suplementaria 4**, se presenta la información demográfica, uso de medicamentos, y desenlaces en mayor detalle.

Se obtuvieron RM postoperatorias inmediatas (<72h) en 25 casos, en los que se determinó la extensión de resección tumoral para los volúmenes de captación de gadolinio (**Tabla 4**).

Durante la hospitalización se realizó una evaluación clínica pre y postoperatoria de todos los pacientes, y se completaron 37 seguimientos ambulatorios precoces (media de 5,7 semanas postoperatorio), y 24 seguimientos tardíos (media de 38,2 semanas postoperatorio). El menor número de controles tardíos se debe a que la sobrevida en las fechas de controles programados fue menor al 60%, sin embargo, para la determinación de sobrevida libre de progresión, se utilizaron datos disponibles en la ficha clínica, registros de atenciones de urgencia en el Servicio de Salud Metropolitano Oriente, y registros del centro de imágenes del Instituto de Neurocirugía Asenjo. Se consideró 1 paciente con pérdida de seguimiento para cálculos de sobrevida libre de progresión. Las escalas clínicas de evaluación pre y postoperatorias se presentan en la **Tabla 4**.

Características generales	
Edad, media en años (SD; n)	58,54 (12,7; 39)
Tiempo de síntomas, media en semanas (SD; n)	15,88 (16,79; 38)
Sexo (H:M)	17:22
HTA, n (%)	20 (51,3%)
DM, n (%)	8 (20,5%)
Resistencia a insulina, n (%)	3 (7,7%)
Tabaquismo, n (%)	15 (38,5%)
Hipotiroidismo, n (%)	5 (12,8%)
Antecedente de otro cáncer, n (%)	4 (10,3%)
Anticonvulsivantes preoperatorios (≥1 semana)	16 (41%)
Corticoides preoperatorios (≥1 semana)	16 (41%)
Cirugía previa, n (%)	2 (5,1%)
Volumen tumoral preoperatorio T1Gd, media en mL (SD; n)	18,8 (18,5; 34)
RM postoperatoria inmediata, n (%)	25 (64,1%)
Grado III, n (%)	5 (12,8%)
Grado IV, n (%)	34 (87,2%)
Tratamientos	
Promedio resección T1Gd, media en % (SD; n)	93,2% (11; 23)
RT realizada, n (%)	21 (53,8%)
QT realizada, n (%)	13 (33,3%)
Performance clínico	
KPS preoperatorio, mediana (ICR; n)	80 (70-90; 39)
ECOG preoperatorio, mediana (ICR; n)	1 (1-2; 39)
KPS postoperatorio, mediana (ICR; n)	80 (60-90; 39)
KPS 30 días, mediana (ICR; n)	80 (60-90; 37)
Desenlace clínico	
Tiempo de seguimiento, media en meses (SD; n)	15,4 (11,9; 39)
Fallecidos durante el seguimiento	31/39 (79,5%)
Sobrevida global, mediana en meses	13,5
Sobrevida libre de progresión, mediana en meses	5,7

Tabla 4. Variables clínicas y demográficas más relevantes de los pacientes con gliomas de alto grado. Se describen características generales, tratamientos, performance clínico y desenlace clínico de todos los pacientes.

10.2 Desenlace clínico

Se completó un seguimiento promedio de 15,4 meses, durante el cual se observó progresión de la enfermedad en 33 pacientes (84,6%) y durante el cual fallecieron 31 pacientes (79,5%). Los pacientes vivos al cierre de este estudio completaron un seguimiento promedio de 32,3 meses.

Las curvas de sobrevida para la población general del estudio y según diagnóstico histológico, se presentan en la **Figura 5**. Para los análisis de sobrevida de pacientes con cirugías previas por el mismo tumor (n=2), se consideró la primera cirugía de resección tumoral como evento índice.

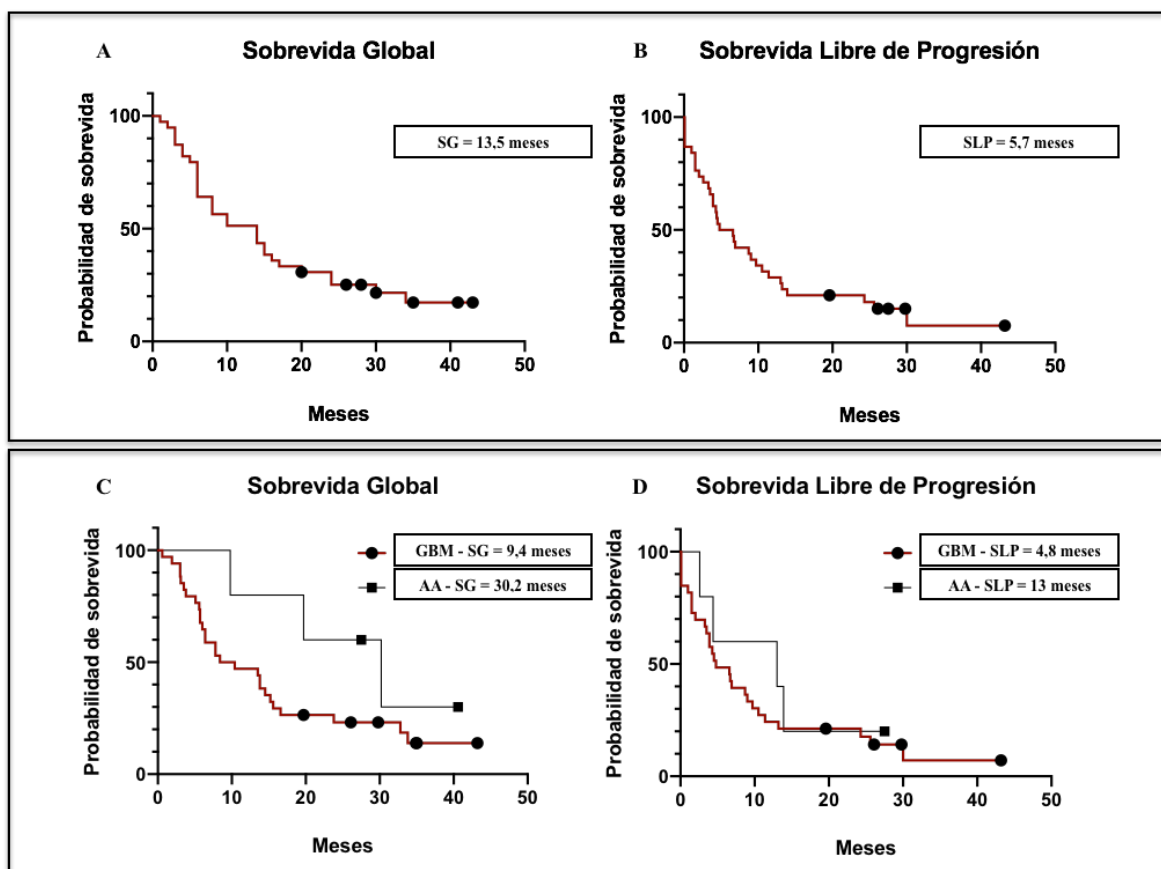


Figura 5. Desenlace clínico de pacientes con gliomas de alto grado, determinado mediante sobrevida global y sobrevida libre de progresión. Se realizó un seguimiento clínico de los pacientes desde la cirugía hasta el término del estudio. Se analizó la sobrevida global (tiempo desde la cirugía de resección tumoral hasta la muerte por cualquier causa) y sobrevida libre de progresión (tiempo desde la cirugía de resección tumoral hasta la progresión clínico-imagenológica de la enfermedad) mediante curvas de Kaplan-Meier. En los paneles A y B, se presentan los desenlaces de todos los pacientes incluidos en el estudio (n=39 para SG, n=38

para SLP). En los paneles C y D se presentan curvas de supervivencia independientes para los pacientes con diagnóstico de GBM (en rojo, n=34 pacientes para SG, n=33 pacientes para SLP) y de astrocitoma anaplásico (en gris, n=5 pacientes). En círculos y cuadrados negros se marcan los pacientes vivos (paneles A y C) y sin progresión (paneles B y D), al término del estudio. AA=Astrocitoma anaplásico. GBM= Glioblastoma. SG=Sobrevivencia global. SLP=Sobrevivencia libre de progresión.

10.3 Resultados – Objetivo 1

10.3.1 Métricas de secuenciación

Se determinó un índice Q mayor a Q30 para el 95,4% de las lecturas de la secuenciación ES1 (panel personalizado Ampliseq™, equipo de secuenciación NextSeq - Illumina), y para el 88,15% de las lecturas de la secuenciación ES2 (panel de amplicones dirigidos a TERT e IDH1/2, equipo de secuenciación MiSeq - Illumina). Para el análisis de variantes, sólo se consideraron lecturas con un índice Q mayor a Q30. El porcentaje de lecturas sobre las áreas de interés (*reads on-target*) fue mayor al 90% en todos los pacientes con suficientes lecturas para el análisis de los datos.

La cobertura media para cada gen de interés se determinó considerando el promedio de los sitios de posibles mutaciones para cada gen (cobertura sobre las posiciones 113T y 135T en el caso de TERTp, cobertura sobre IDH1 e IDH2 en el caso de IDH). En los casos donde se identificó una variante de interés, se consideró la cobertura específica sobre la posición que apoya dicha variante. La cobertura media para TERTp fue 359 (mín:103; máx:1235), la cobertura media de IDH fue 6960 (mín:85; máx:36573), y la cobertura media de EGFR fue 21788 (mín:1635;

máx:150057). Las profundidades de las coberturas para los 3 genes de interés en cada paciente se presenta en la **Figura 6**.

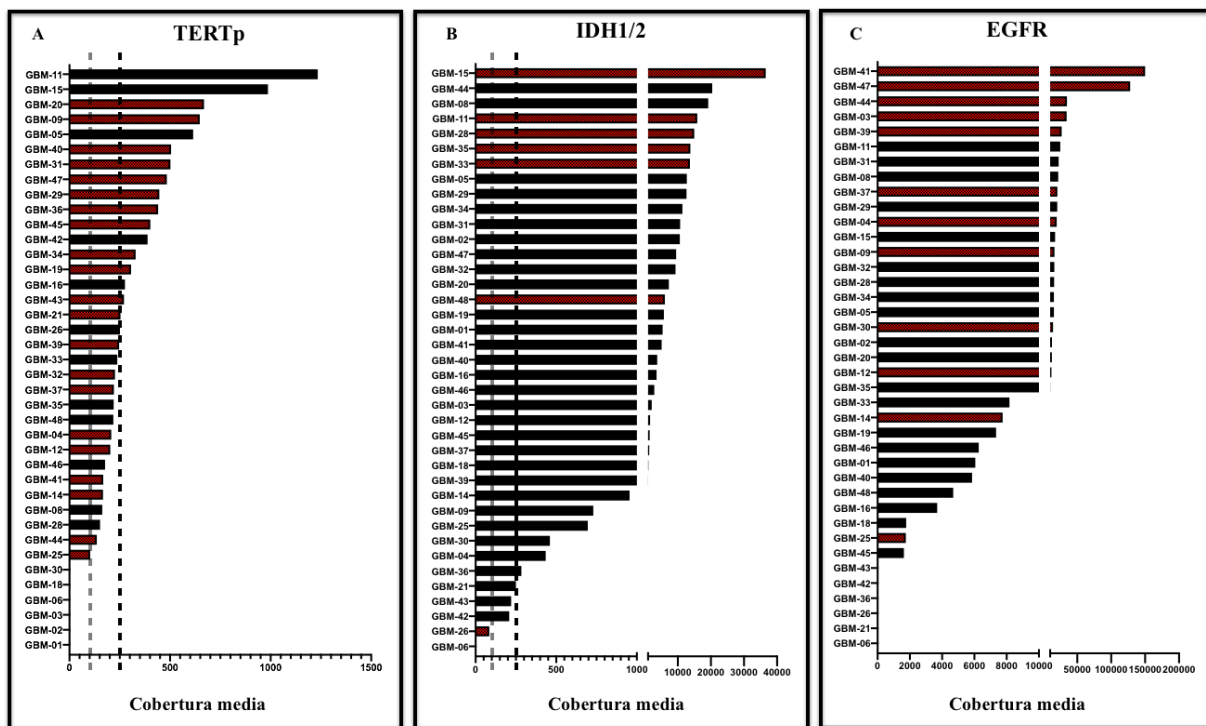


Figura 6. *Número de lecturas sobre posiciones de interés en secuenciación masiva paralela de los genes TERTp, IDH1/2 y EGFR, para cada paciente.* Se presenta la profundidad de cobertura media sobre las posiciones de interés de los genes TERTp (panel A), IDH1/2 (panel B) y EGFR (panel C), para cada uno de los pacientes. La cobertura media para TERTp fue 359 (mín;103; máx:1235), la cobertura media de IDH fue 6960 (mín:85; máx:36573), y la cobertura media de EGFR fue 21788 (mín:1635; máx:150057). Se marcan en rojo las muestras de tejido tumoral en las que se identificó una variante, o amplificación en el caso de EGFR. Como referencia, en los paneles A y B, se señala con líneas verticales intermitentes la profundidad de cobertura 100X y 250X.

En el caso de la ES1, no se obtuvieron lecturas suficientes para el análisis de los datos en 6 pacientes. En el caso de la ES2, no se obtuvieron lecturas suficientes para el análisis en 1 paciente, y no se dispuso de material genético suficiente para la secuenciación de 5 pacientes. Sólo 1 paciente tuvo lecturas insuficientes en ambas estrategias de secuenciación (GBM-06), que corresponde al único paciente sin información disponible para el análisis de mutaciones de IDH1/2. Esta limitación del estudio se discutirá en detalle más adelante.

10.3.2 Análisis de número de copias de EGFR

Para cada paciente, se obtuvieron razones de amplificación del gen EGFR en comparación a 3 muestras control, que fueron secuenciadas en paralelo. El número promedio de lecturas sobre las áreas de interés del gen EGFR con el que se realizó el análisis de número de copias fue 21788 para los tumores (mín:1635; máx:150057) y 8802 para el tejido control (mín:4701; máx:12901). 12 pacientes presentaron un aumento significativo del número de copias del gen EGFR, con una razón de amplificación promedio de 8 veces, y un rango de 1,4 a 29 veces. En la **Figura 7** se presenta un gráfico representativo del análisis de número de copias para 2 pacientes, y las razones de amplificación e intervalos de confianza para la amplificación de EGFR de todos los pacientes se presentan en la **Tabla Suplementaria 6**.

10.3.3 Frecuencia de mutaciones de TERTp e IDH1/2

21 de 33 pacientes con adecuada profundidad de secuenciación presentaron mutaciones de TERTp. El número promedio de lecturas que apoyaron las variantes de TERTp fue 118,8 (mín:14; máx:272). La frecuencia alélica promedio de mutaciones de TERTp fue de 34%, con un rango de 7 a 48%. Se identificaron 17 pacientes con mutaciones de TERTp en la posición 113T, y 4 pacientes con mutaciones de TERTp en la posición 135T.

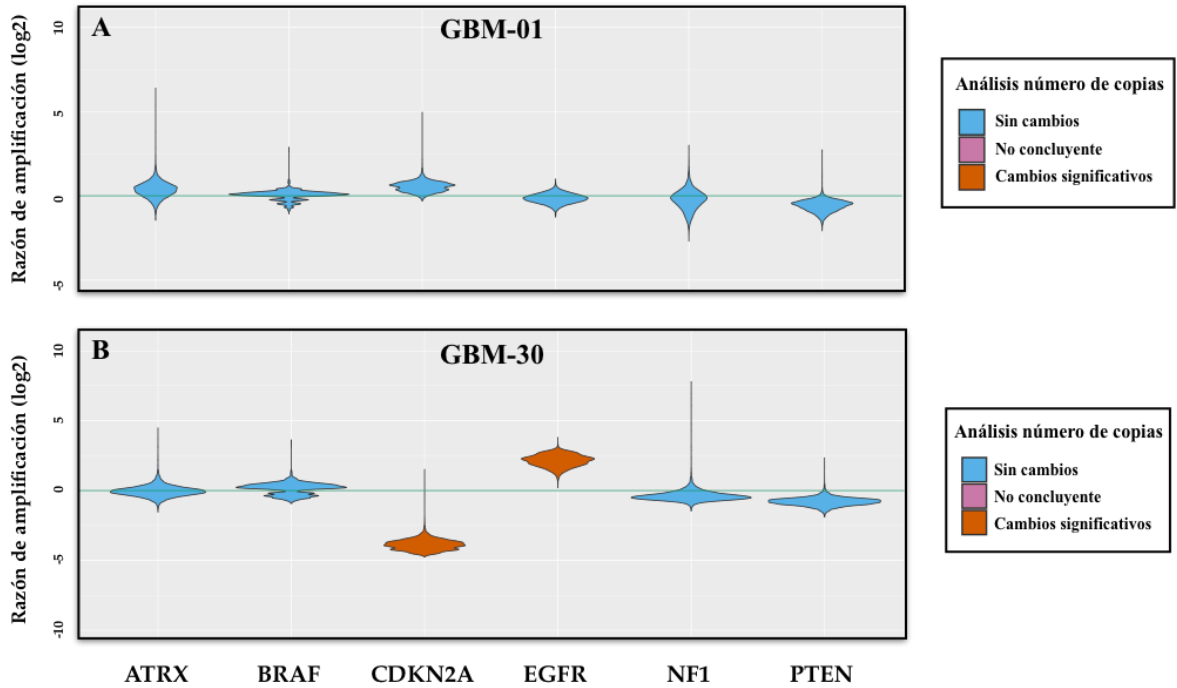


Figura 7. Análisis de variación de número de copias de EGFR mediante secuenciación masiva paralela. Se analizó el cambio en número de copias de los genes de los genes ATRX, BRAF, CDKN2A, EGFR, NF1 y PTEN, utilizando el programa CNVpanelizer, y se presenta el log₂ de las razones de amplificación en comparación a muestras de tejido control sano. (A) Ejemplo representativo del paciente GBM-01, el cual no presentó ninguna alteración en el número de copias de los genes analizados. (B) Ejemplo representativo del paciente GBM-30, con amplificación de EGFR y delección de CDKN2A. A la derecha, se presenta el código colores asociado a cambios significativos, resultados no concluyentes y ausencia de cambios en número de copias.

7 de 38 pacientes con adecuada profundidad de secuenciación presentaron mutaciones de IDH1, de las cuales 6 casos correspondieron a mutaciones R132H y 1 caso a la mutación R132S. No se detectaron mutaciones en el gen IDH2 en esta cohorte de pacientes. El número promedio de lecturas que apoyaron las variantes de IDH1 fue 6447, con un mínimo de 38 y un máximo de

17921 lecturas, presentando la mayor variabilidad de cobertura entre los marcadores analizados. Esta mayor variabilidad está dada principalmente porque IDH1/2 se evaluó utilizando las 2 estrategias de secuenciación y en 5 casos sólo se obtuvieron suficientes lecturas en la ES2. Para los 33 casos con resultados de IDH1/2 obtenidos mediante las 2 estrategias de secuenciación, la concordancia en la identificación de variantes fue de un 100%. La frecuencia alélica promedio de mutaciones de IDH1 fue de 45%, con un rango de 37 a 49%. Ninguno de los pacientes con mutaciones de IDH1 presentó mutaciones de TERTp ni amplificación de EGFR. En la **Figura 8** se presenta una representación gráfica de los resultados del objetivo 1.

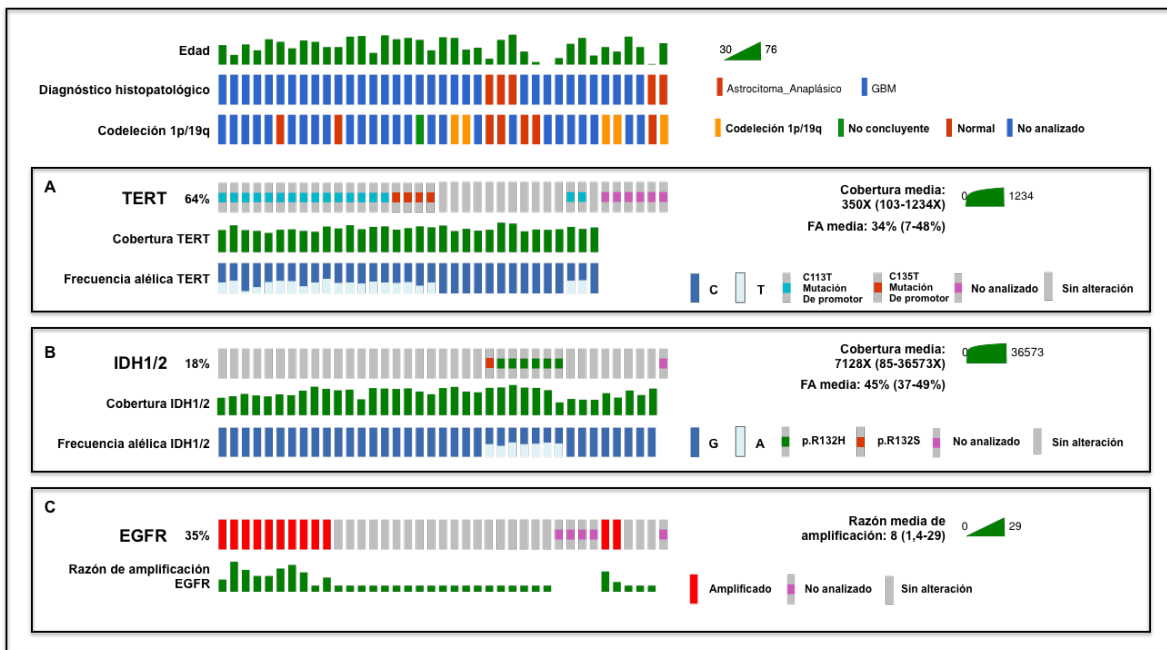


Figura 8. Representación gráfica de los resultados de secuenciación masiva paralela para los genes de interés. En el encabezado, se presenta la edad, el diagnóstico histopatológico y la presencia de codelección 1p/19q, organizados en columnas para cada paciente. En los paneles A y B se presenta un esquema de la frecuencia de las distintas alteraciones genéticas, la profundidad de cobertura media de secuenciación y la frecuencia alélica de cada variante para

TERTp e IDH1/2, respectivamente. En el panel C, se presenta la frecuencia y la razón de amplificación para el gen EGFR, determinado mediante la herramienta CNVpanelizer. Las mutaciones específicas identificadas para TERTp e IDH, los rangos de profundidad de cobertura, frecuencia alélica y razón de amplificación de EGFR se indican en la codificación de colores a la derecha de cada panel, según corresponde. FA = frecuencia alélica.

10.4 Resultados – Objetivo 2

10.4.1 Niveles de expresión génica en tejido tumoral

Se determinaron los niveles de activación de UPR a nivel de expresión génica mediante qPCR en 38 pacientes. Además, se evaluó la expresión de genes involucrados en procesos de migración e invasión celular, inflamación y angiogénesis, que previamente se han reportado asociados a la activación de UPR (48). Los niveles de los distintos transcritos se presentan como razón de cambio en comparación a tejido cerebral control y como z-score en la **Figura 9**.

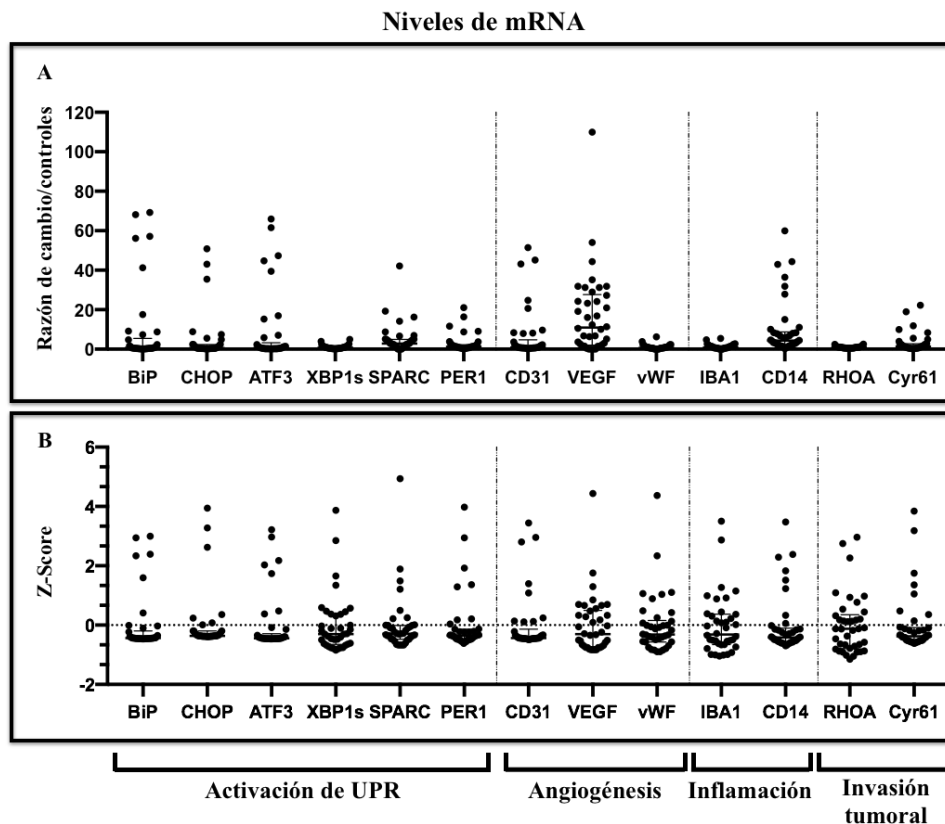


Figura 9. Niveles de mRNA en tejido tumoral de gliomas de alto grado, presentados como razón de cambio en comparación a tejido cerebral control, y como z-score. Se amplificaron distintos transcritos de marcadores de activación de UPR y otros procesos de cáncer mediante PCR cuantitativo para 38 pacientes con gliomas de alto grado y 5 pacientes control. (A) Se presenta la razón de cambio para cada transcrito en comparación a tejido cerebral control, y normalizado utilizando la combinación de 2 controles de carga constitutivos (actina y GAPDH), como referencia. (B) Se presentan los valores ajustados para cada transcrito mediante un z-score ($z = (x - \mu) / \sigma$, donde x = valor original, μ = media, σ = desviación standard). Se agruparon los distintos marcadores de acuerdo a los principales procesos en los que participan (UPR, angiogénesis, inflamación o invasión tumoral).

Dado que existe una gran variabilidad en los niveles de expresión de cada marcador, y que estudiaremos múltiples variables, se realizó un análisis de componentes principales en el que se incluyeron todos los marcadores de UPR y cáncer disponibles, para priorizar el análisis de aquellos que sean capaces de explicar la mayor variabilidad entre distintos pacientes, con una menor complejidad de variables (**Figura 10**). Se identificaron 2 componentes principales (PC1 y PC2), capaces de explicar el 77% de la variabilidad de los pacientes, las que presentaron correlación significativa con 11 de las 13 variables analizadas. Estas variables se consideraron para un análisis de clústers jerárquicos de doble dendrograma, mediante el cual se definieron 3 clústers de genes (1 al 3) y 3 clústers de pacientes (A al C), de acuerdo a los niveles de expresión de los genes analizados (**Figura 11**). VEGF y XBP1s fueron menos relevantes en términos de su capacidad de explicar la variabilidad entre pacientes, y no se incluyeron en el análisis de clústers jerárquicos, para optimizar el rendimiento del análisis.

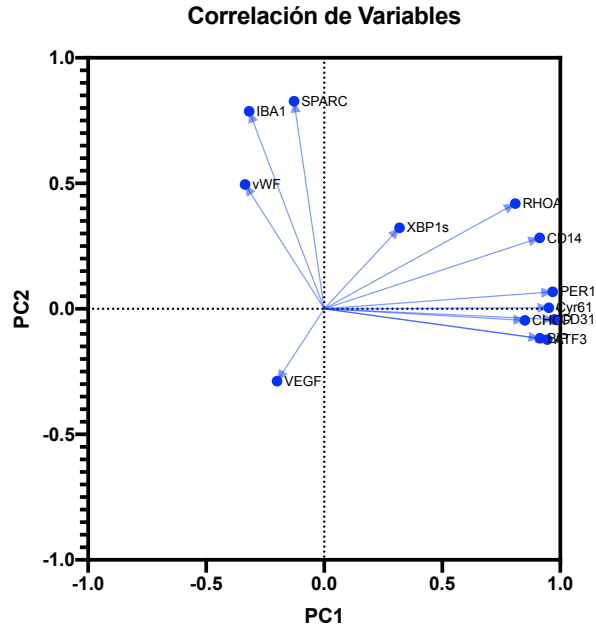


Figura 10. Correlación entre niveles de expresión de genes asociados a UPR – cáncer y componentes principales PC1 y PC2. Se realizó un análisis de componentes principales como aproximación inicial a los resultados de expresión génica. Se presenta la correlación de los componentes principales (PC1 y PC2) con los niveles de expresión de cada uno de los genes asociados a UPR y otros procesos de cáncer. Se observa una alta correlación entre PC1 y las variables: RHOA, CD14, PER1, Cyr61, CD31, CHOP, BiP y ATF3; y entre PC2 y las variables: vWF, IBA1 y SPARC. Las variables XBP1s y VEGF se correlacionan escasamente a las componentes principales, por lo que explicarían poca variabilidad entre pacientes. PC1 = Componente principal 1. PC2 = Componente principal 2.

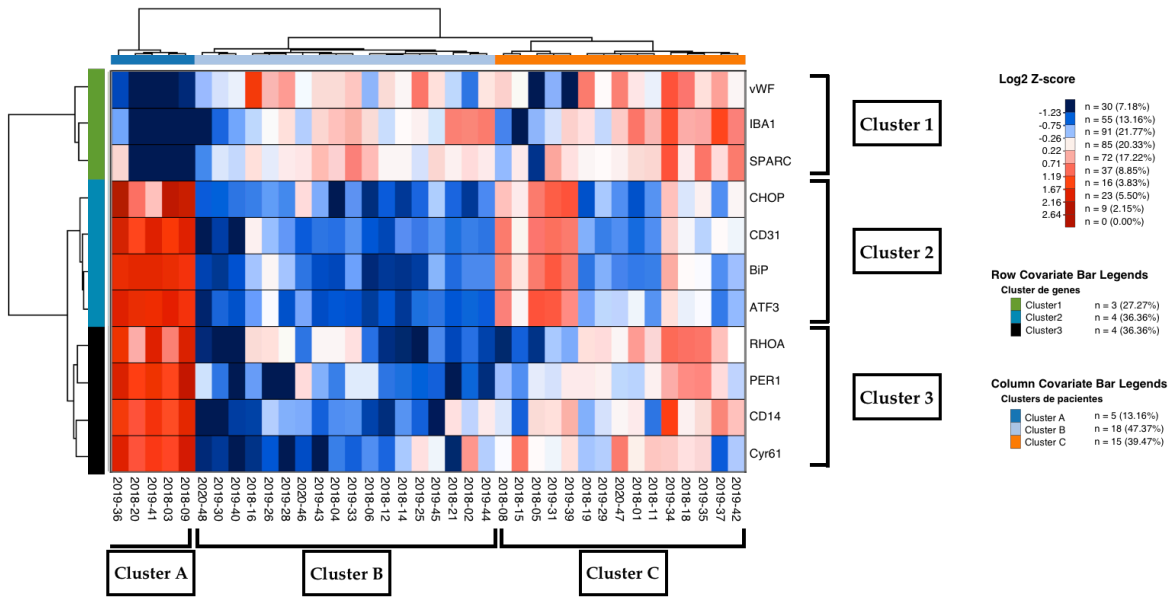


Figura 11. Análisis de clústers jerárquicos con doble dendrograma – Mapa de colores de expresión génica. Se realizó un análisis de clústers jerárquicos de doble dendrograma con las variables seleccionadas en el análisis de componentes principales (Figura 10), que se presenta como un mapa de colores. Cada fila representa una variable de expresión génica de UPR – cáncer, agrupadas de forma jerárquica en 3 grupos (clústers 1 al 3). Cada columna representa un paciente, agrupados de forma jerárquica en 3 grupos (clústers A al C). A la derecha, se presenta código de colores para los valores normalizados utilizando el log2 del z-score, los colores asignados a cada clúster y el número de genes y pacientes asignados a cada clúster. Se determinó una categorización de genes (clústers 1 al 3) y pacientes (clústers A al C), que utilizaremos en análisis posteriores.

En base a las 2 estrategias de jerarquización utilizadas (análisis de componentes principales y clústers jerárquicos), presentaremos los resultados subsecuentes agrupando los distintos marcadores en 3 clústers: **1)** vWF, IBA1, SPARC, **2)** CD31, CHOP, BiP, ATF3 y **3)** RHOA, CD14, PER1, Cyr61. Los resultados de VEGF y XBP1s se presentarán de forma separada. El análisis de clústers jerárquicos permitió definir además 3 grupos de pacientes en base a los

niveles de expresión de los genes analizados, que se distribuyeron de la siguiente forma: clúster A con 5 pacientes, clúster B con 18 pacientes, y clúster C con 15 pacientes.

Adicionalmente, para evaluar el posible efecto de variables independientes externas al tumor sobre los marcadores de UPR – cáncer, se realizaron regresiones lineales univariable para determinar la capacidad de dichas variables de explicar la variabilidad de los marcadores entre distintos pacientes. En este análisis se incluyeron las siguientes variables: edad, sexo, uso de corticoides preoperatorios durante ≥ 1 semana, uso de anticonvulsivantes preoperatorios durante ≥ 1 semana, protocolo intraoperatorio de manejo de muestra y comorbilidades (hipertensión arterial (HTA), diabetes (DM) y tabaquismo). En la **Tabla 5** se presentan los valores p para cada regresión univariable. Aquellos marcadores con más de 1 variable independiente con un valor $p < 0,25$ se consideraron para un análisis multivariado, que se presenta en la **Tabla 6**. Se obtuvieron modelos capaces de explicar parte de la variabilidad entre pacientes en el caso de CHOP y XBP1s. En el caso de CHOP, el modelo de regresión multivariada presenta un coeficiente de determinación $R^2 = 0,162$, por lo que el 16,2% de la variabilidad del marcador se puede explicar por el uso de corticoides preoperatorios y la concomitancia de HTA. En el caso de XBP1s, el coeficiente de determinación $R^2 = 0,319$ sugiere que el 31,9% de la variabilidad de este marcador está determinada por el protocolo de manejo de muestra y el tabaquismo. De esta forma, para validar las comparaciones posteriores de estos marcadores en base a la presencia o ausencia de marcadores genéticos, se evaluó la posible asociación de las mutaciones de IDH1/2, TERTp y amplificación de EGFR con las variables que explican parte de la variabilidad de CHOP y XBP1s (HTA, uso de corticoides, tabaquismo y protocolo de manejo de muestras). En la **Tabla 7**, se presentan los valores p de la prueba exacta de Fisher, en la que no se encontraron asociaciones significativas. Dado que las variables genéticas fueron independientes de las

variables externas que explican parte de la variabilidad de CHOP y XBP1s, consideramos válidas las comparaciones de medias entre grupos definidos por marcadores genéticos que se realizarán más adelante. Sin embargo, las variables CHOP y XBP1s no se considerarán para la construcción de modelos de sobrevida.

	BiP	CHOP	CD31	ATF3	XBP1s	RHOA	CD14	PER1	Cyr61	IBA1	VEGF	vWF	SPARC
Edad	0,271	0,968	0,529	0,352	0,674	0,778	0,541	0,926	0,911	0,589	0,192*	0,996	0,84
Sexo	0,645	0,491	0,765	0,985	0,516	0,624	0,851	0,828	0,902	0,564	0,587	0,787	0,847
Corticoides	0,372	0,15*	0,469	0,202	0,747	0,505	0,868	0,274	0,315	0,074	0,967	0,95	0,364
Anticonvulsivantes	0,213	0,657	0,153	0,264	0,957	0,089	0,187	0,15	0,239	0,43	0,314	0,664	0,932
HTA	0,963	0,127*	0,568	0,595	0,138*	0,276	0,586	0,284	0,273	0,985	0,382	0,644	0,85
DM	0,38	0,466	0,417	0,479	0,714	0,44	0,43	0,386	0,263	0,267	0,942	0,582	0,966
Tabaquismo	0,609	0,657	0,741	0,795	0,011*	0,482	0,55	0,965	0,899	0,276	0,673	0,961	0,504
Manejo de muestra	0,841	0,888	0,572	0,933	0,011*	0,452	0,396	0,762	0,963	0,211	0,306	0,584	0,059

Tabla 5. Regresiones lineales univariable de niveles de expresión génica sobre variables clínicas y comorbilidades de los pacientes. Se presenta la significancia estadística (valores p) de regresiones lineales univariable de los distintos marcadores de UPR – cáncer a nivel de mRNA, sobre variables externas que podrían explicar variabilidad entre pacientes. Se identificaron 2 o más variables con un valor $p < 0,25$ en el caso de XBP1s y CHOP, por lo que se consideraron para un modelo de regresión multivariable.

		Coefficiente	Valores p	Significancia del modelo	R ²
CHOP	Corticoides	-0,65	0,05	0,045	0,162
	HTA	-0,664	0,043		
XBP1s	Manejo de muestra	-0,633	0,038	0,0041	0,319
	HTA	-0,449	0,118		
	Tabaquismo	-0,66	0,032		

Tabla 6. Modelos de regresión multivariable para CHOP y XBP1s, sobre variables seleccionadas en regresiones univariable. Se presentan los coeficientes y valor p de cada

variable, y las significancias y coeficientes de determinación (R^2) para cada modelo. Ambos modelos fueron significativos, con un valor $p < 0,05$, por lo que un 16,2% y un 31,9% de la variabilidad entre pacientes se podría explicar por las variables externas incluidas en cada modelo, respectivamente.

	TERT	IDH	EGFR	TERT/IDH
Corticoides	0,469	0,203	0,163	0,187
HTA	0,481	0,405	1,000	0,531
Manejo de muestra	0,157	0,427	1,000	0,284
Tabaquismo	1,000	0,227	1,000	0,264

Tabla 7. Comparación de frecuencias de uso de corticoides, HTA, protocolo de manejo de muestras y tabaquismo entre pacientes con distintos marcadores genéticos. Significancia estadística (valores p) de la prueba exacta de Fisher para la asociación de los marcadores genéticos estudiados (y los grupos definidos por la combinación de TERT e IDH) y las variables externas que explican parte de la variabilidad entre pacientes, identificadas en los modelos de regresión multivariable descritos previamente.

Por último, y para categorizar específicamente pacientes con mayor o menor activación de UPR, realizamos un análisis de clústers jerárquicos considerando solo niveles de expresión génica de marcadores directamente relacionados a UPR. De esta forma, definimos un grupo de alta activación de UPR con 9 pacientes, y un grupo de baja activación de UPR con 29 pacientes, como se muestra en la **Figura 12**.

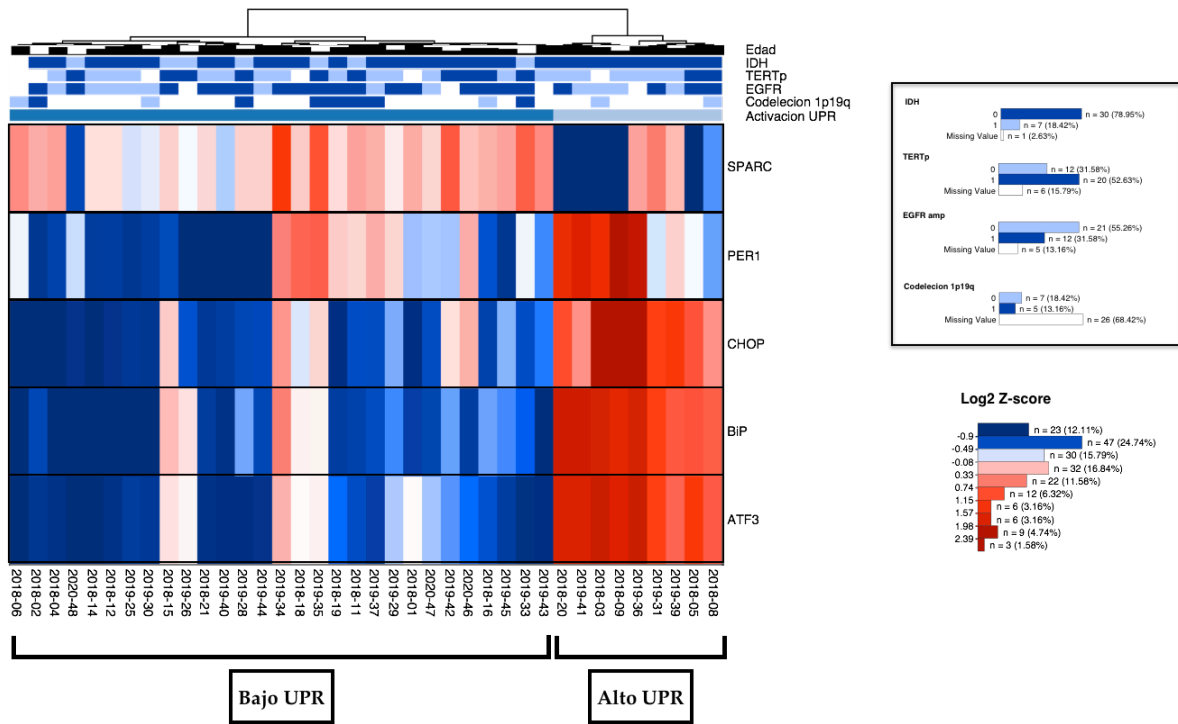
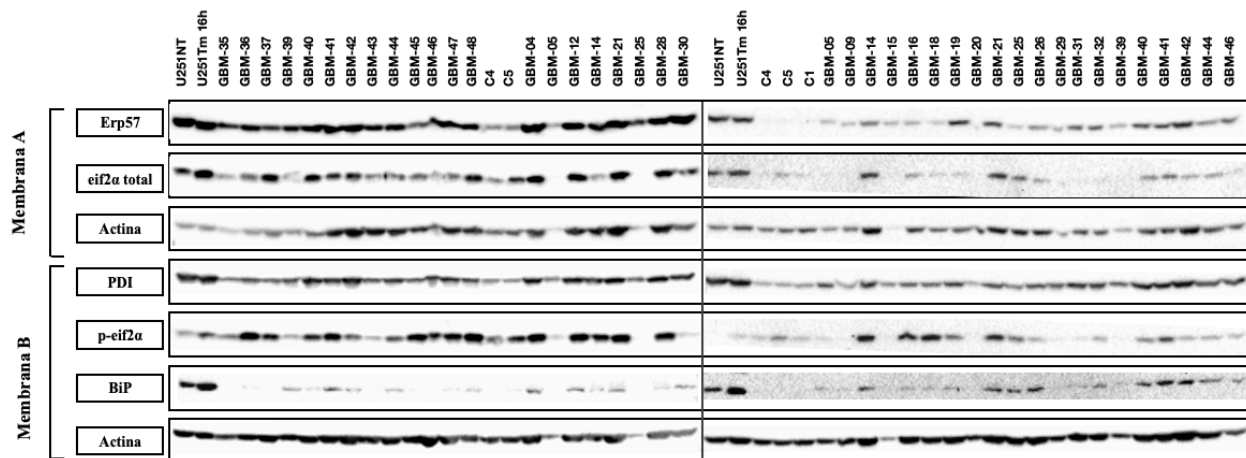


Figura 12. Análisis de clústers jerárquicos de un dendrograma – Mapa de colores de expresión génica de marcadores de UPR. Se realizó un análisis de clústers jerárquicos de doble dendrograma con los niveles de expresión génica asociados a UPR. Cada fila representa una variable de UPR. Cada columna representa un paciente, agrupados de forma jerárquica en 2 grupos: alta y baja activación de UPR. En las filas superiores se presenta el estado de mutaciones de IDH1/2, TERTp, amplificación de EGFR, codeleción 1p/19q y clasificación de activación de UPR alta o baja para cada paciente: no se observaron diferencias significativas en la frecuencia de estas alteraciones entre los grupos con distinta activación de UPR (tabla de contingencia se presenta en la Tabla 10). A la derecha, se presenta el código de colores para las distintas alteraciones genéticas de las filas superiores, y el código de colores para los niveles de expresión génica normalizados mediante log2 del z-score. Se observa que 9 pacientes fueron categorizados con alta activación de UPR, y 29 pacientes con baja activación de UPR. Utilizaremos esta clasificación en análisis posteriores.



10.4.2 Determinación de niveles de proteínas relacionadas a UPR en tejido tumoral

Se determinaron los niveles de chaperonas como medida de estrés de RE (BiP) y activación de genes blanco de la UPR (ERp57 y PDI). Además, se determinó la fosforilación de eif2 α como medida de activación de la vía PERK de UPR. Los resultados de la determinación de niveles proteicos se presentan en la **Figura 13**, mientras que la cuantificación de razones de cambio en comparación a tejido cerebral normal y los resultados ajustados con un z- score, se presentan en la **Figura 14**,. De forma similar a lo observado en los niveles de expresión génica, los marcadores de UPR a nivel proteico presentaron una dispersión amplia y distribución no normal, por lo que para favorecer futuras comparaciones y análisis estadístico, los resultados se presentan como z-score.

Figura 13. Niveles de proteínas de UPR en pacientes con gliomas de alto grado y tejido control (Western blot). Se determinaron los niveles proteicos de ERp57, PDI, p-eif2 α , eif2 α -total, BiP y actina mediante Western blots en geles de acrilamida – membranas de PVDF. En cada pocillo se cargaron 45-60ug de proteínas. Se evaluaron muestras de tejido tumoral, pacientes control y células de la línea tumoral de glioblastoma humano U251 (control positivo), que se presentan

en cada columna. Se muestran resultados de 4 experimentos; en la parte superior: 2 experimentos para determinar de forma sucesiva los niveles de ERp57 – eif2 α total – actina (membrana A) y en la parte inferior: 2 experimentos para determinar de forma sucesiva los niveles de PDI – p-eif2 α – BiP – actina (membrana B). La intensidad de señal se cuantificó utilizando el programa Image Lab (v6.0.1). Todos los valores se normalizaron utilizando actina como control de carga, y la comparación entre distintos experimentos se realizó mediante la determinación de una razón de carga, en relación a muestras control, para cada membrana.

Niveles de Proteínas

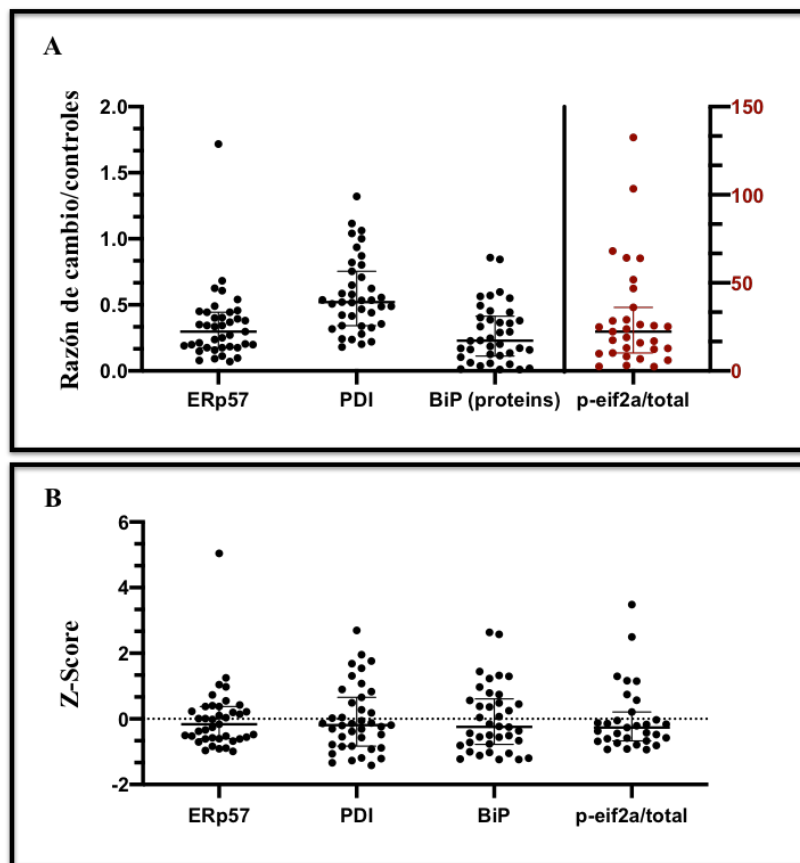


Figura 14. Niveles de proteínas de UPR en tejido tumoral de gliomas de alto grado, presentados como razón de cambio en comparación a tejido cerebral control, y como z-score.

Se determinaron los niveles de distintas proteínas asociadas a UPR, para 39 pacientes con

gliomas de alto grado y 5 controles. (A) Se presenta la razón de cambio para niveles cada proteína en comparación a tejido cerebral control, y normalizando por actina. (B), se presentan los valores ajustados para cada proteína mediante un z-score ($z = (x-\mu)/\sigma$, donde x = valor original, μ = media, σ = desviación standard).

De forma similar al análisis de marcadores de expresión génica, se evaluó el posible efecto de variables independientes externas al tumor sobre los marcadores proteicos de UPR. Se realizaron regresiones lineales univariable para determinar la capacidad de dichas variables de explicar la variabilidad de los marcadores entre distintos pacientes, cuya significancia se presenta en la **Tabla 8**. En el caso de BiP y ERp57, se realizaron modelos de regresión multivariable, que no mostraron resultados significativos, y se presentan en la **Tabla 9**.

	ERp57	PDI	p-eif2a	BiP
Edad	0,275	0,345	0,727	0,742
Sexo	0,311	0,868	0,531	0,173*
Corticoides	0,248*	0,3	0,427	0,56
Manejo de muestra	0,889	0,787	0,427	0,881
Anticonvulsivantes	0,543	0,436	0,189*	0,752
Hipertensión arterial	0,156*	0,815	0,669	0,085*
Diabetes	0,677	0,924	0,268	0,935
Tabaquismo	0,323	0,718	0,686	0,799

Tabla 8. Regresiones lineales univariable de niveles de proteínas de UPR sobre variables clínicas y comorbilidades de los pacientes. Se presenta la significancia estadística (valores p) de regresiones lineales univariable de los distintos marcadores de UPR-cáncer a nivel de proteínas, sobre variables externas que podrían explicar variabilidad entre pacientes. Se identificaron 2 o más variables con un valor $p < 0,25$ en el caso de ERp57 y BiP, por lo que se consideraron para un modelo de regresión multivariable.

		Coefficiente	Valores p	Significancia del modelo	R ²
ERp57	Corticoides	-0,098	0,382	0,2519	0,0938
	Hipertensión arterial	0,132	0,234		
BiP (proteínas)	Sexo	0,095	0,217	0,1073	0,1474
	Hipertensión arterial	0,124	0,107		

Tabla 9. Modelos de regresión multivariable para ERp57 y BiP (proteínas). Se presentan los coeficientes y valor p para cada variable, y las significancias y coeficientes de determinación (R²) para cada modelo. Ninguno de los modelos explica significativamente la variabilidad entre pacientes.

Para evaluar la relación de los distintos marcadores de UPR – cáncer entre sí, se realizaron análisis de correlación, que se presentan como matriz de correlaciones en un mapa de colores en la **Figura 15**. Se observa una alta correlación entre los marcadores de expresión génica de los clústers 2 y 3 entre sí, y correlaciones negativas con los marcadores del clúster 1. A su vez, entre los marcadores del clúster 1 se observan correlaciones significativas entre SPARC e IBA1 y vWF. A nivel de proteínas, se observa (i) una correlación moderada entre las proteínas chaperonas ERp57 y PDI entre sí, y con los niveles de expresión de VEGF, y (ii) una baja-moderada correlación entre p-eif2 α /eif2 α -total y los niveles de expresión de vWF. La asociación entre distintas variables que comparten vías de señalización específicas permite describir procesos de forma consistente, y estos resultados son consecuentes con las estrategias de jerarquización utilizadas previamente.

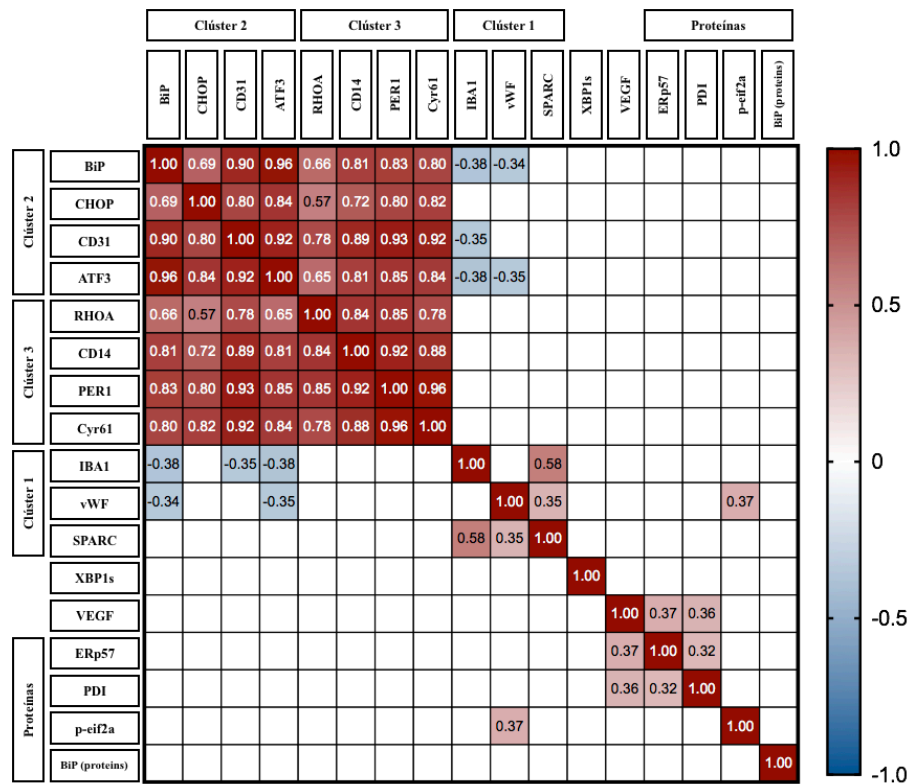


Figura 15. Matriz de correlaciones entre variables de UPR y otros procesos de cáncer, a nivel de mRNA y proteínas. Se analizó la correlación de las distintas variables de activación de UPR y otros procesos de cáncer, utilizando una matriz de correlaciones. Las distintas variables se dispusieron en filas y columnas, agrupadas por clústers (1 al 3) y por tipo de variable. Se presentan los coeficientes r de Pearson para todas las correlaciones estadísticamente significativas ($p < 0,05$) utilizando un mapa de colores, mientras que los espacios en blanco corresponden a una ausencia de correlación. A la derecha de la matriz, se muestra la codificación de colores para los coeficientes r . Se observa una fuerte correlación positiva entre marcadores de expresión génica de los clústers 2 y 3 entre sí, del clúster 1 entre sí, y una correlación débil-moderada entre niveles de proteínas de UPR. Además, se observa una correlación negativa entre niveles expresión de algunos genes del clúster 1 y los del clúster 2 y

3. Destaca la escasa correlación entre marcadores de UPR a nivel de expresión génica y proteínas.

10.4.3 Activación de UPR y expresión de distintos marcadores de cáncer

Finalmente, realizamos una comparación de los distintos niveles de expresión génica de marcadores de inflamación (IBA1 y CD14), angiogénesis (vWF, VEGF, CD31) e invasión tumoral (RHOA y Cyr61) en grupos determinados por el nivel de activación de UPR. Los resultados se presentan en la **Figura 16**, en la que se observan diferencias en marcadores asociados a los 3 procesos estudiados, sin embargo, con resultados heterogéneos dentro de los marcadores de inflamación y angiogénesis, lo que se discutirá más adelante.

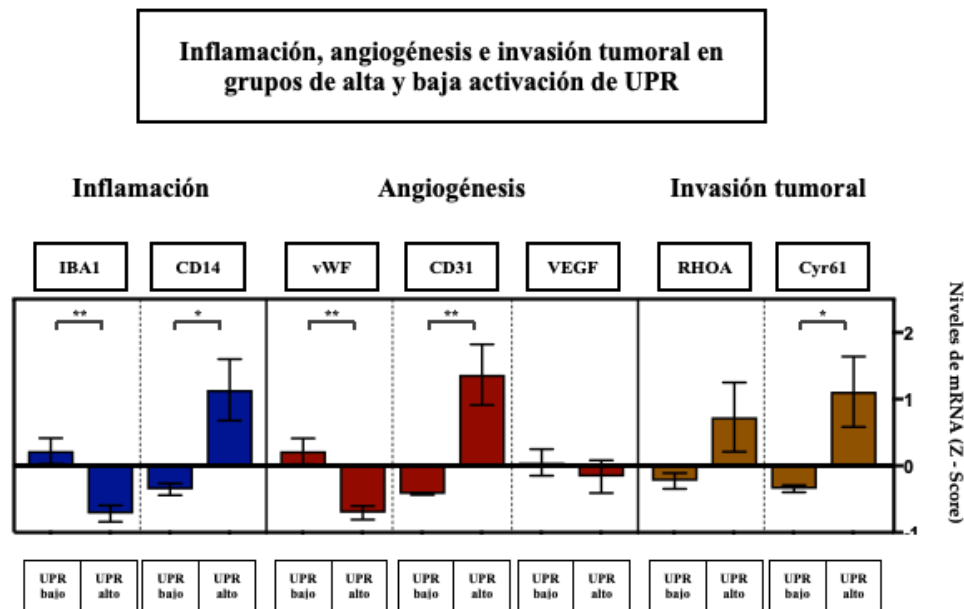


Figura 16. Niveles de expresión génica de los distintos marcadores de inflamación, angiogénesis e invasión tumoral, en grupos de pacientes definidos según nivel de activación de UPR. Se realizó una comparación de medias de niveles de expresión génica de marcadores de inflamación (IBA1, CD14), angiogénesis (vWF, CD31 y VEGF), e invasión tumoral (RHOA y Cyr61), entre grupos de pacientes definidos previamente con alta activación de UPR (n=9

pacientes) o baja activación de UPR (n=29 pacientes), mediante la prueba t de Student. Los resultados se presentan como z-score, y en cada barra se grafica el error standard de la media.

**= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$.*

10.5 Resultados – Objetivo 3

10.5.1 Activación de UPR y marcadores de cáncer en distintos grupos moleculares de GBM

De acuerdo a la pregunta de investigación propuesta en esta tesis doctoral, se analizó la relación entre la activación de distintos marcadores de UPR y la presencia de alteraciones genéticas relevantes en GBM. En la **Figura 17**, se presentan comparaciones de los niveles de expresión génica para los distintos marcadores de UPR – cáncer entre grupos definidos por la presencia o ausencia de mutaciones de TERTp, IDH1/2 o la amplificación de EGFR.

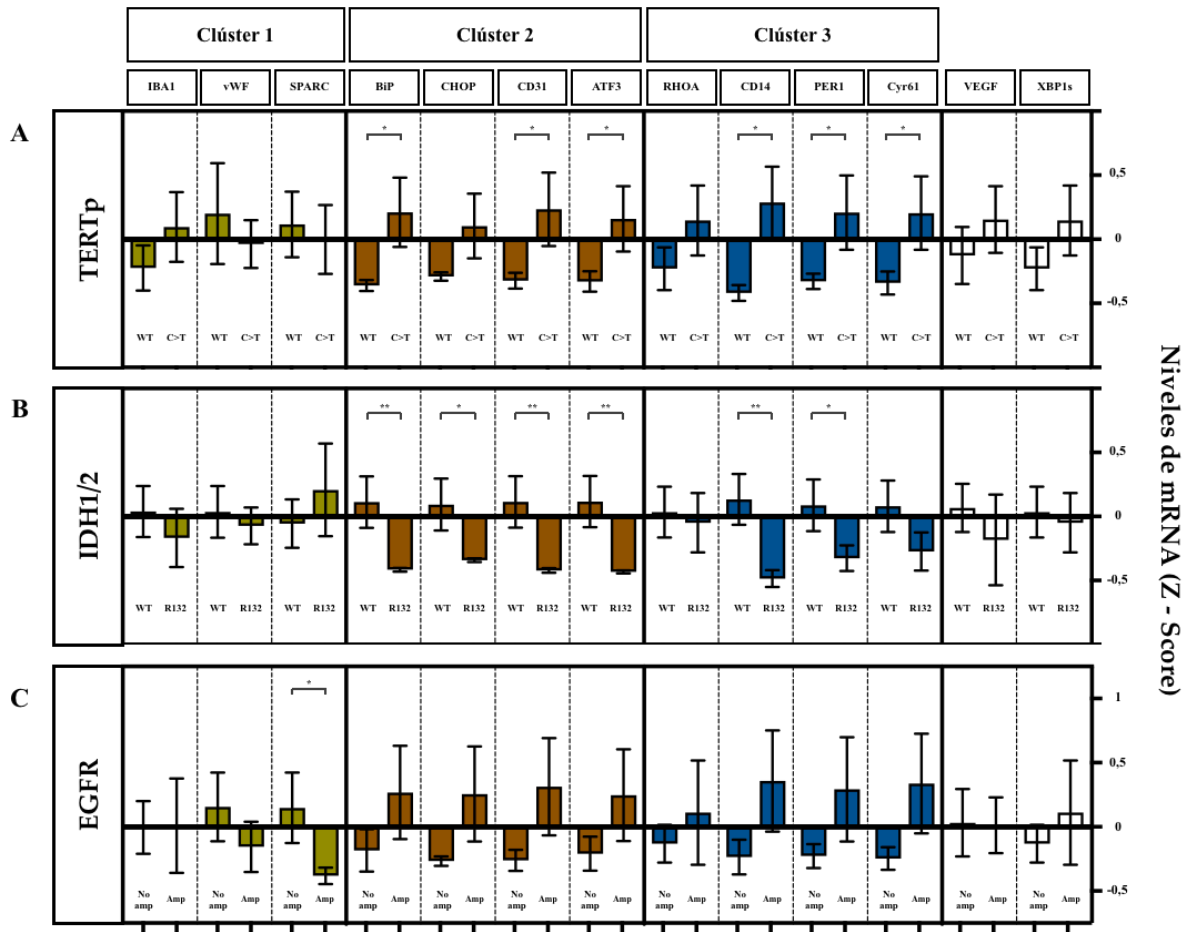


Figura 17. Niveles de expresión génica de marcadores de UPR y otros procesos de cáncer en distintos grupos genéticos. Se realizó una comparación de medias de niveles de expresión génica de UPR y otros procesos de cáncer, agrupados en clústers del 1 al 3 (definidos previamente), entre pacientes con distintos marcadores genéticos, mediante la prueba t de Student. Se presenta la comparación de medias entre grupos de pacientes determinados por mutaciones de TERTp (panel A), entre grupos de pacientes determinados por mutaciones de IDH1/2 (panel B) y entre grupos de pacientes determinados por la amplificación de EGFR (panel C). Los niveles de expresión génica se presentan como z-score, y en cada barra se grafica el error standard de la media. Para cada columna, se indica el grupo WT = wild-type, con ausencia de la mutación respectiva; C>T = mutación puntual C113T/C135T de TERTp; R132:

*mutación puntual R132H/R132S de IDH1; No amp = sin amplificación de EGFR; Amp = Con amplificación de EGFR. *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$.*

En esta figura se observan diferencias significativas en la mayoría de los marcadores de los clústers 2 y 3 al comparar grupos de pacientes en base a la presencia de mutaciones de IDH1/2 o TERTp. La comparación de los mismos grupos para los marcadores incluidos en el clúster 1, además de VEGF y XBP1s, no mostraron diferencias significativas. Por otra parte, al clasificar a los pacientes en base a la presencia o ausencia de amplificación de EGFR, sólo se encontraron diferencias entre grupos para el marcador SPARC, cuya interpretación aislada es compleja dado que no hubo diferencias en otros marcadores analizados, que podrían compartir una vía de señalización.

En base a estos resultados, se decidió realizar un análisis de grupos definidos por la combinación de mutaciones de TERTp e IDH1/2, sin incluir la amplificación de EGFR. En el primer grupo se incluyeron 20 pacientes con mutaciones de TERTp y sin mutaciones de IDH1/2, en el segundo grupo se incluyeron 5 pacientes sin mutaciones de TERTp ni IDH1/2, y en el tercer grupo se incluyeron 7 pacientes con mutaciones de IDH1/2 y sin mutaciones de TERTp. Los resultados de la comparación de los distintos clústers de marcadores en base a estos 3 grupos, se presentan en las **Figuras 18 a 20**

Clúster 1 - Grupos genéticos definidos por TERTp e IDH1/2

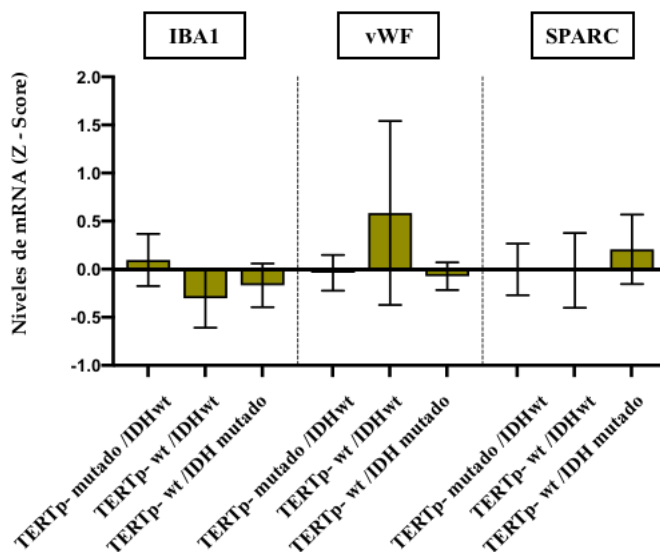


Figura 18. Niveles de expresión génica de los marcadores de UPR – cáncer del clúster 1, en grupos de pacientes definidos por la presencia de mutaciones de TERTp e IDH1/2. Se realizó una comparación de medias de los niveles de expresión de IBA1, vWF y SPARC entre 3 grupos de pacientes definidos por la combinación de mutaciones de TERTp e IDH1/2, mediante una regresión heterocedástica. Los niveles de expresión génica se presentan como z-score, y en cada barra se grafica el error standard de la media.

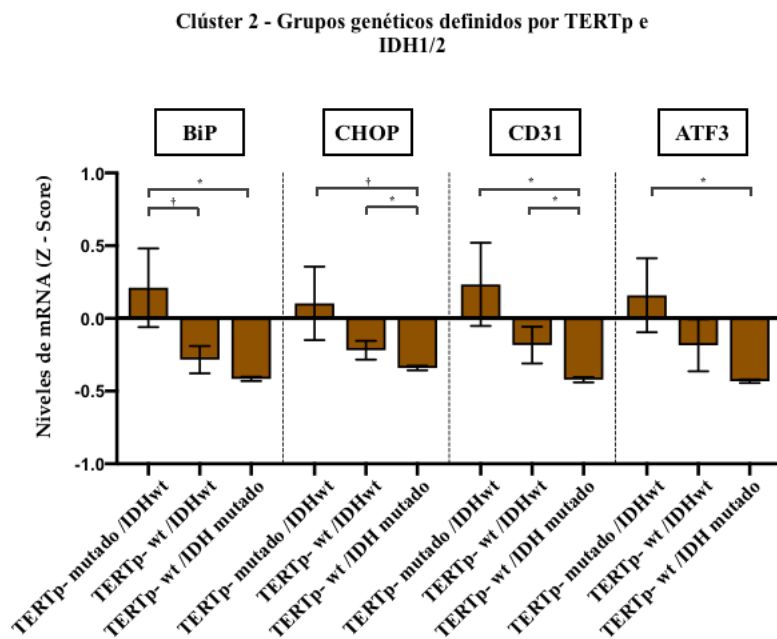


Figura 19. Niveles de expresión génica de los marcadores de UPR – cáncer del clúster 2, en grupos de pacientes definidos por la presencia de mutaciones de TERTp e IDH1/2. Se realizó una comparación de medias de los niveles de expresión de BiP, CHOP, CD31 y ATF3 entre 3 grupos de pacientes definidos por la combinación de mutaciones de TERTp e IDH1/2, mediante una regresión heterocedástica. Los niveles de expresión génica se presentan como z-score, y en cada barra se grafica el error standard de la media. $*=p<0,05$; $†=0,05<p<0,1$.

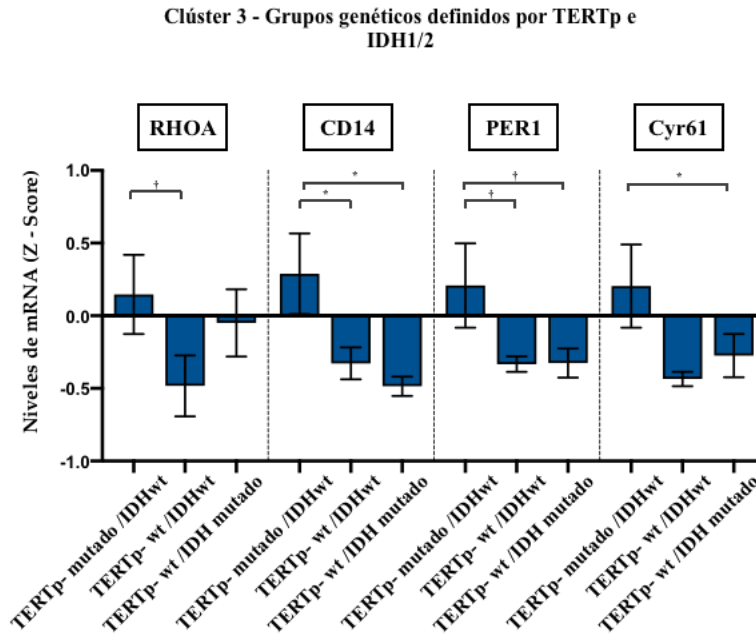


Figura 20. Niveles de expresión génica de los marcadores de UPR – cáncer del clúster 3, en grupos de pacientes definidos por la presencia de mutaciones de TERTp e IDH1/2. Se realizó una comparación de medias de los niveles de expresión de RHOA, CD14, PER1 y Cyr61 entre 3 grupos de pacientes definidos por la combinación de mutaciones de TERTp e IDH1/2, mediante una regresión heterocedástica. Los niveles de expresión génica se presentan como z-score, y en cada barra se grafica el error standard de la media. $*$ = $p < 0,05$; $†$ = $0,05 < p < 0,1$.

Al analizar los datos de esta forma, se observan diferencias entre grupos genéticos que no fueron evidentes al realizar los análisis anteriores, como en el caso de CHOP y Cyr61, en que el grupo de pacientes con mutaciones de IDH presentó menores niveles de expresión génica. Por otra parte, resultados como el de PER1 presentan una significancia estadística límite, posiblemente relacionada al menor número de pacientes en el grupo de pacientes TERTp wt – IDHwt (n=5), lo que se discutirá más adelante.

De forma similar, se analizó la relación entre los niveles de proteínas relacionadas a UPR y la presencia de los distintos marcadores genéticos de GBM, que se presentan en la **Figura 21**.

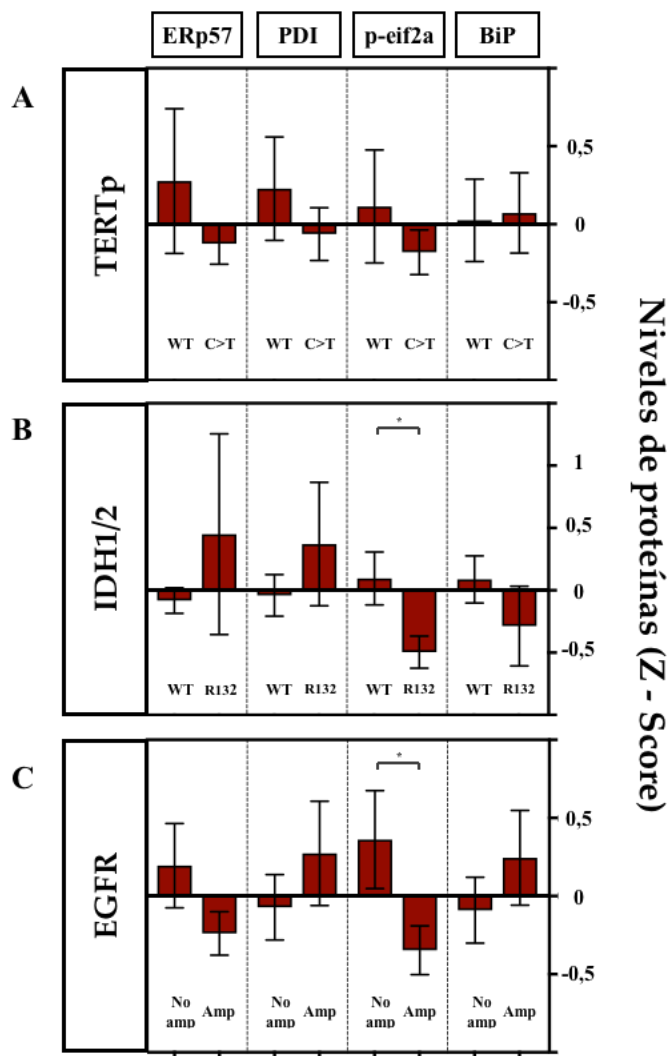


Figura 21. Niveles proteicos de marcadores de UPR en distintos grupos genéticos. Se realizó una comparación de medias de los niveles proteicos de ERp57, PDI, p-eif2a y BiP entre pacientes con distintos marcadores genéticos, mediante la prueba t de Student. Se presenta la comparación de medias entre grupos de pacientes determinados por mutaciones de TERTp (panel A), entre grupos de pacientes determinados por mutaciones de IDH1/2 (panel B) y entre grupos de pacientes determinados por la amplificación de EGFR (panel C). Los niveles

*proteicos se presentan como z-score, y en cada barra se grafica el error standard de la media. Para cada columna, se indica el grupo WT = wild-type, con ausencia de la mutación respectiva; C>T = mutación puntual C113T/C135T de TERTp; R132: mutación puntual R132H/R132S de IDH1; No amp = sin amplificación de EGFR; Amp = Con amplificación de EGFR. *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$.*

Al comparar los niveles de proteínas de UPR en base a la presencia de alteraciones genéticas, observamos menores niveles de fosforilación de eif2 α en presencia de mutaciones de IDH y de amplificación de EGFR. En base a estos resultados y los presentados previamente a nivel de mRNA, se decidió realizar un análisis de grupos definidos por la combinación de mutaciones de TERTp e IDH1/2 (**Figura 22**), y por la combinación mutaciones de IDH1/2 y amplificación de EGFR (**Figura 23**).

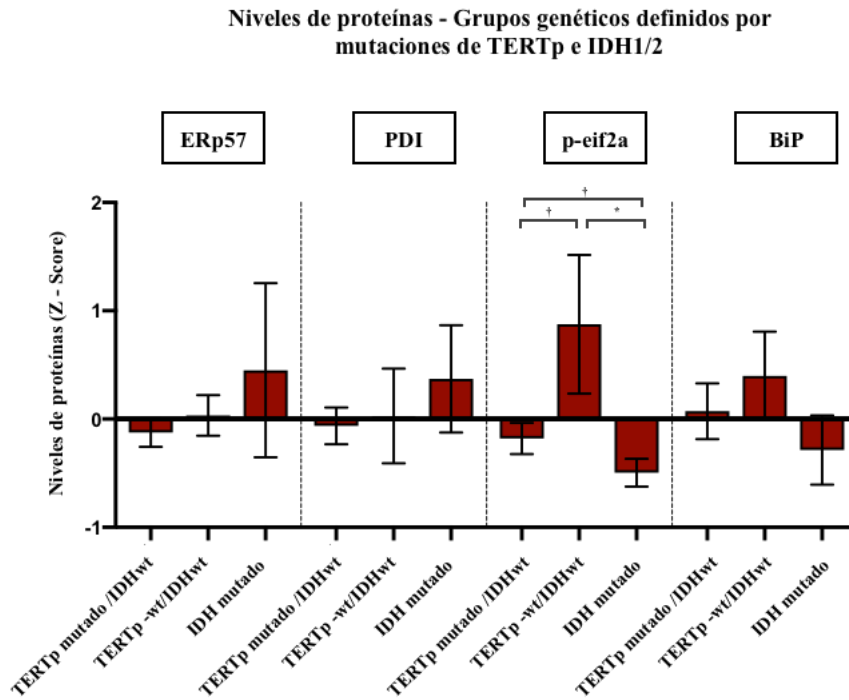


Figura 22. Niveles proteicos de los distintos marcadores de UPR en grupos de pacientes definidos por la presencia de mutaciones de TERTp e IDH1/2. Se realizó una comparación de medias de los niveles proteicos de ERp57, PDI, p-eif2a y BiP entre 3 grupos de pacientes definidos por la combinación de mutaciones de TERTp e IDH1/2, mediante una regresión heterocedástica. Los niveles proteicos se presentan como z-score, y en cada barra, se grafica el error standard de la media. *= $p < 0,05$; †= $0,05 < p < 0,1$.

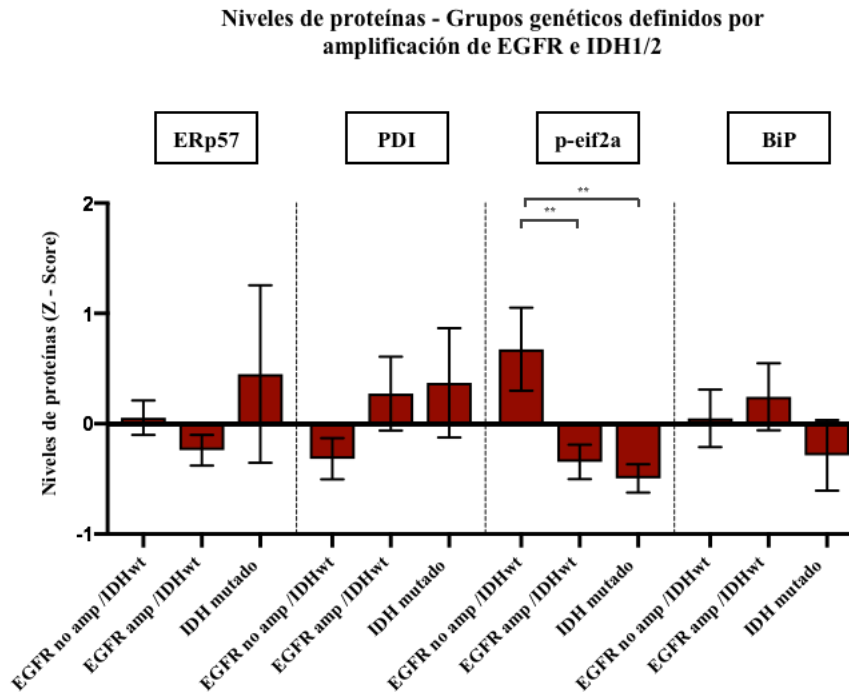


Figura 23.. Niveles proteicos de los distintos marcadores de UPR en grupos de pacientes definidos por la presencia de amplificación de EGFR y mutaciones de IDH1/2. Se realizó una comparación de medias de los niveles proteicos de ERp57, PDI, p-eif2a y BiP entre 3 grupos de pacientes definidos por la combinación de la presencia de mutaciones de IDH1/2 y la amplificación de EGFR, mediante una regresión heterocedástica. Los niveles proteicos se presentan como z-score, y en cada barra, se grafica el error standard de la media. $*=p<0,05$; $\dagger= 0,05<p<0,1$.

En este caso, se observa que las diferencias en los niveles de fosforilación de eif2 α entre grupos se mantienen –y siguen una tendencia– al clasificar a los pacientes en base a mutaciones de IDH y amplificación de EGFR.

Posteriormente, se analizó la distribución de pacientes con altos niveles de UPR y bajos niveles de UPR en los distintos grupos genéticos, definido por mutaciones de TERTp e IDH1/2, que se presenta en la **Tabla 10**. Se observa una ausencia de pacientes con altos niveles de UPR en el grupo de pacientes con IDH mutado y TERTp-wt, sin embargo, al comparar las frecuencias encontradas con las frecuencias predichas, el valor p para la prueba exacta de Fisher = 0,207, por lo que no se consideró como una diferencia significativa.

	TERTp mutado IDH-wt	TERTp-wt IDH-wt	TERTp-wt IDH mutado	Total
UPR bajo	15	3	7	25
UPR alto	6	2	0	8
Total	21	5	7	33

Tabla 10. Distribución de pacientes con altos niveles de UPR y bajos niveles de UPR en los distintos grupos genéticos. Se presenta una tabla de contingencia para la comparación de frecuencias de pacientes con altos y bajos niveles de activación UPR en los distintos grupos genéticos **definido por mutaciones de TERTp e IDH1/2. Se analizó la asociación de variables** mediante la prueba exacta de Fisher, sin encontrar diferencias significativas entre los grupos (p=0,207).

10.5.2 Análisis de sobrevida – Comparación entre grupos, y análisis de variables pronósticas.

A continuación, comparamos las curvas de sobrevida global y sobrevida libre de progresión, entre grupos de pacientes definidos por la presencia de mutaciones de TERTp, IDH1/2 o amplificación de EGFR. Las diferencias en tiempos de desenlaces clínicos entre grupos se han reportado ampliamente en la literatura, y en términos generales, la población de este estudio

presentó un comportamiento similar a lo descrito para pacientes con gliomas de alto grado en el resto del mundo. Las curvas de sobrevida se presentan en la **Figura 24**.

Los pacientes con mutaciones TERTp tuvieron una menor sobrevida global que los pacientes sin mutaciones de TERTp (6,4 vs 26,25 meses; $p=0,016$; $n=33$), al igual que una menor sobrevida libre de progresión (3,9 vs 13,55 meses; $p=0,002$; $n=33$) (**Figura 24 A y B**). Al comparar la sobrevida en base a la presencia de mutaciones de IDH, se obtuvieron diferencias con significancia límite, con una mayor sobrevida global (32,8 vs 8,4 meses; $p=0,098$, $n=38$) y una mayor sobrevida libre de progresión para pacientes con mutaciones de IDH (13,9 vs 4,4 meses; $p=0,086$; $n=37$) (**Figura 24 C y D**). De forma similar a lo descrito en la literatura, no se observaron diferencias en tiempos de sobrevida global ni sobrevida libre de progresión en relación a la amplificación de EGFR (**Figura 24 E y F**).

Al comparar las curvas de sobrevida en base a un sistema de clasificación basado en la combinación de mutaciones de TERTp e IDH, es posible identificar diferencias graduales en los 3 grupos, con una mayor sobrevida global para el grupo IDH mutado TERTp-wt (32,8 meses; $n=7$), una sobrevida intermedia para el grupo IDH-wt y TERTp-wt (16,6 meses; $n=5$) y una menor sobrevida para el grupo de pacientes con IDHwt y TERTp mutado (6,4 meses; $n=21$) ($p=0,045$). Este hallazgo fue similar al comparar sobrevidas libres de progresión, con una mayor sobrevida libre de progresión para el grupo IDH mutado TERTp-wt (13,9 meses; $n=7$), una sobrevida intermedia para el grupo IDH-wt y TERTp-wt (13,2 meses; $n=5$) y una menor sobrevida para el grupo de pacientes con IDHwt y TERTp mutado (3,9 meses; $n=21$) ($p=0,009$).

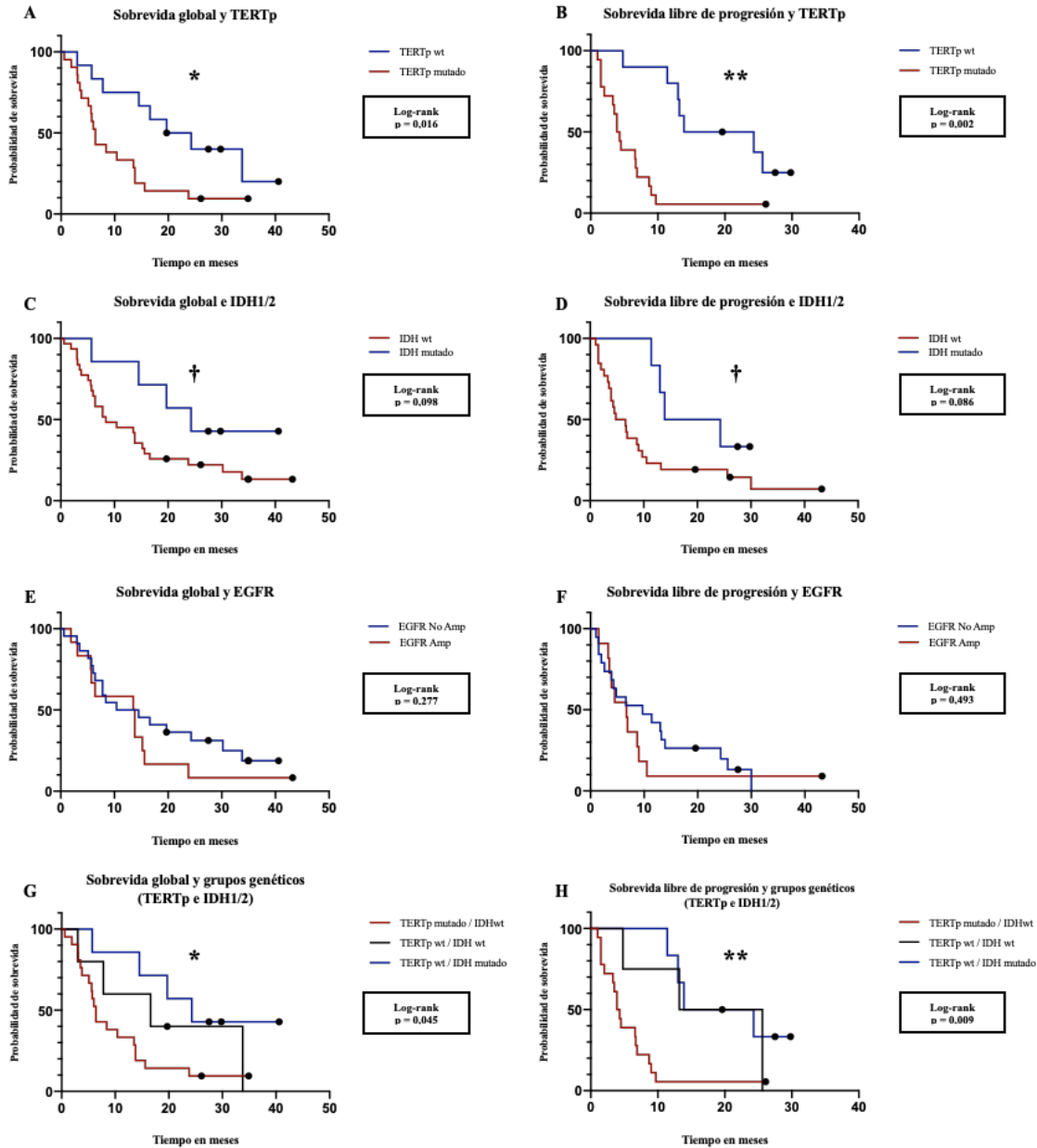


Figura 24. Desenlace clínico de pacientes con distintos marcadores genéticos, determinado mediante sobrevida global y sobrevida libre de progresión. Se compararon los desenlaces clínicos de pacientes con distintos marcadores genéticos, mediante la prueba de Log-rank para comparación de curvas de Kaplan-Meier de sobrevida global y sobrevida libre de progresión. Los pacientes con mutaciones TERTp tuvieron una menor sobrevida global que los pacientes sin mutaciones de TERTp (6,4 meses (n=21) vs 26,25 meses (n=12); p=0,016) (panel A), y una

menor sobrevida libre de progresión (3,9 meses (n=21) vs 13,55 meses (n=12); p=0,002) (panel B). Los pacientes con mutaciones de IDH, tuvieron una mayor sobrevida global (32,8 meses (n=7) vs 8,4 meses (n=31); p= 0,098) (panel C) y una mayor sobrevida libre de progresión (13,9 meses (n=7) vs 4,4 meses (n=30); p=0,086) (panel D). No se observaron diferencias en tiempos de sobrevida global (p=0,277) (panel E) ni sobrevida libre de progresión (p=0,493) (panel F) en relación a la amplificación de EGFR. La clasificación de pacientes utilizando mutaciones de TERTp e iDH mostró que los pacientes con IDHwt - TERTp mutado tuvieron la menor sobrevida global (6,4 meses; n=21) (panel G) y sobrevida libre de progresión (3,9 meses; n=21) (p=0,009) (panel H). El grupo IDHwt - TERTp-wt tuvo una sobrevida global intermedia (16,6 meses; n=5) (panel G) y una sobrevida libre de progresión intermedia (13,2 meses; n=5) (panel H). El grupo IDH mutado - TERTp-wt tuvo la mayor sobrevida global (32,8 meses; n= 7; p=0,045) (panel G) y la mayor sobrevida libre de progresión (13,9 meses; n=7; p=0,009) (panel H). En cada panel se presentan los valores p de la prueba de Log-rank de la comparación de curvas de sobrevida y la codificación de colores de cada curva. En cada gráfico, los círculos negros marcan los pacientes vivos o sin progresión al cierre del estudio, para las curvas de sobrevida global y de sobrevida libre de progresión, respectivamente. *= p<0,05; **=p<0,01; †= 0,05<p<0,1

Adicionalmente, y como aproximación inicial al análisis de la relación entre activación de UPR y desenlaces clínicos, comparamos las curvas de sobrevida en base a la clasificación de pacientes cuyo tejido tumoral presentó altos niveles de UPR versus bajos niveles de UPR, según lo descrito previamente en la **Figura 12**. Se presenta la comparación de curvas de sobrevida global y sobrevida libre de progresión, en la que no se observan diferencias entre grupos, en la **Figura 25**.

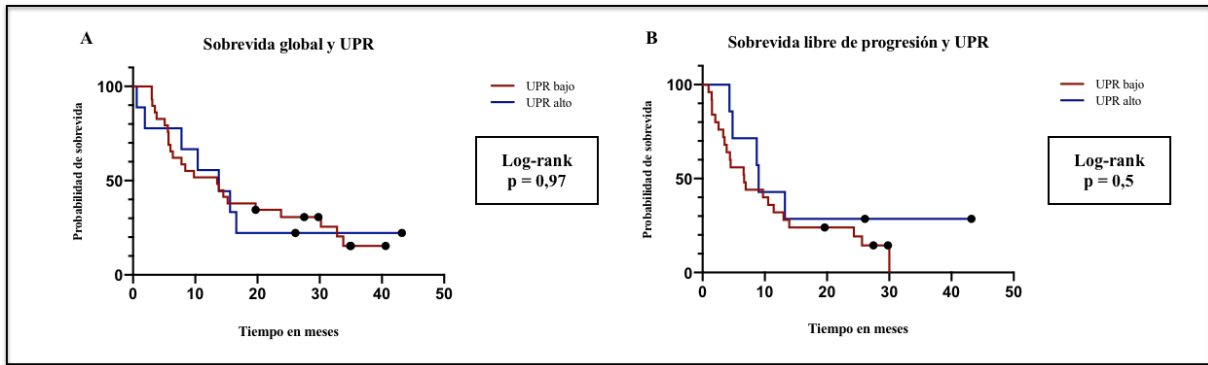


Figura 25. *Desenlace clínico de pacientes con distintos niveles de activación de UPR, determinado mediante sobrevida global y sobrevida libre de progresión. Se analizaron los desenlaces clínicos de pacientes con distintos niveles de activación de UPR (definidos previamente), mediante la prueba de Log-rank para comparación de curvas de Kaplan-Meier de sobrevida global y sobrevida libre de progresión. No hubo diferencias significativas entre los grupos, para sobrevida global (UPR alto $n=9$, UPR bajo $n=29$; $p=0,97$) (panel A) ni sobrevida libre de progresión (UPR alto $n=9$, UPR bajo $n=28$; $p=0,501$) (panel B). En cada gráfico, los círculos negros marcan los pacientes vivos o sin progresión al cierre del estudio, para las curvas de sobrevida global y de sobrevida libre de progresión, respectivamente. En cada panel, se presentan los valores p de la prueba de Log-rank para la comparación de curvas de sobrevida y la codificación de colores de cada curva.*

Por otra parte, se analizaron las curvas de sobrevida global y libre de progresión de los distintos grupos de pacientes definidos mediante análisis de clústers jerárquicos en base a la expresión génica de todos los transcritos relevantes, según lo descrito en la **Figura 11**. La comparación de estas curvas no mostró diferencias significativas en los desenlaces clínicos entre los distintos grupos de pacientes (**Figura 26**).

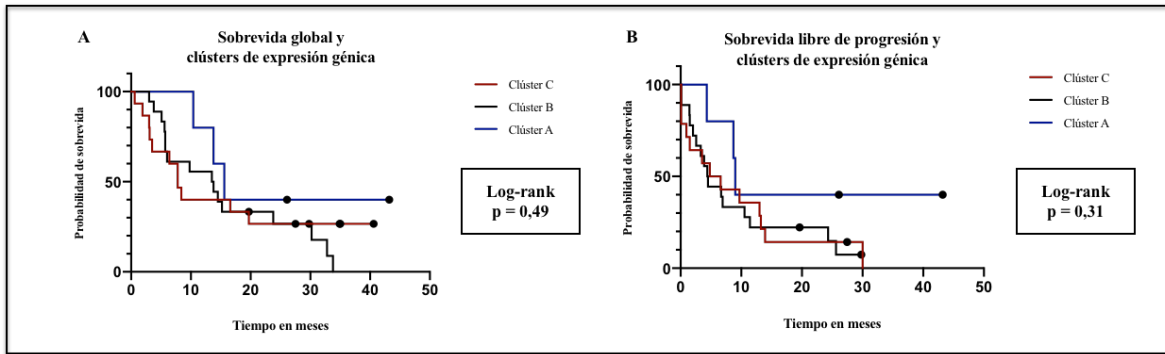


Figura 26. *Desenlace clínico de pacientes clasificados en distintos grupos, según categorización jerárquica basada en expresión génica de UPR y otros procesos de cáncer, determinado mediante sobrevida global y sobrevida libre de progresión. Se compararon los desenlaces clínicos de pacientes categorizados en clústers A al C (definidos previamente utilizando categorización jerárquica de la Figura 11), mediante la prueba de Log-rank para comparación de curvas de Kaplan-Meier de sobrevida global y sobrevida libre de progresión. No hubo diferencias significativas entre los grupos, para sobrevida global (Clúster A n=5, Clúster B n=18, Clúster C n=15; p=0,49) (panel A) ni sobrevida libre de progresión (Clúster A n=5, Clúster B n=18, Clúster C n=14; p=0,31) (panel B). En cada gráfico, los círculos negros marcan los pacientes vivos o sin progresión al cierre del estudio, para las curvas de sobrevida global y de sobrevida libre de progresión, respectivamente. En cada panel, se presentan los valores p de la prueba de Log-rank para la comparación de curvas de sobrevida y la codificación de colores de cada curva.*

Para describir más detalladamente la relación entre los marcadores de UPR – cáncer y la sobrevida de pacientes con gliomas de alto grado, realizamos un análisis de regresión de Cox univariable para todos los marcadores (**Tabla 11**). Posteriormente, se consideraron las variables con un valor $p < 0,25$ en el análisis univariable para realizar una regresión multivariable, que se presenta en la **Tabla 12**.

	HR	Std. err	z	P> z	[95% CI]	
BiP	0,847	0,167	-0,840	0,399	0,576	1,246
CD31	0,841	0,168	-0,870	0,387	0,568	1,245
ATF3	0,791	0,161	-1,150	0,250*	0,531	1,180
RHOA	0,699	0,153	-1,630	0,103	0,454	1,074
CD14	0,943	0,174	-0,320	0,750	0,657	1,353
PER1	0,729	0,181	-1,270	0,203*	0,449	1,186
Cyr61	0,789	0,175	-1,070	0,284	0,511	1,218
IBA1	1,389	0,259	1,760	0,078*	0,964	2,002
VEGF	1,131	0,214	0,650	0,515	0,780	1,640
vWF	0,934	0,159	-0,400	0,689	0,669	1,304
SPARC	1,269	0,252	1,200	0,231*	0,860	1,874
ERp57	0,489	0,394	-0,890	0,549	0,622	1,287
PDI	0,943	0,638	-0,090	0,677	0,774	1,483
p-eif2a	0,984	0,009	-1,880	0,260	0,374	1,021
BiP (proteínas)	1,021	0,977	0,020	0,983	0,156	6,666
Clúster UPR alto	0,984	0,424	-0,04	0,971	0,422	2,292

Tabla 11. Modelos de regresión univarada para posibles variables pronósticas de sobrevida global en pacientes con gliomas de alto grado. Se presentan los coeficientes de riesgo instantáneo, error standard, intervalos de confianza y valores p de las regresiones de Cox univariable para cada uno de los marcadores de UPR – cáncer a nivel de expresión génica y proteínas. Se retuvieron para el análisis multivariable todos los factores con un valor $p < 0,25$ (*) (ATF3, PER1, IBA1, SPARC).

A partir del modelo completo

$p = 0,4583 \geq 0,1000$ se removi3 ATF3

$p = 0,3396 \geq 0,1000$ se removi3 PER1

	HR	Error standard	z	P> z	[95% CI]	
IBA1	1,486	0,284	1,93	0,043	0,993	2,134
RHOA	0,652	0,160	-1,74	0,087	0,403	1,056

Tabla 12. Modelo de regresión multivariable para posibles variables pron3sticas de sobrevida global en pacientes con gliomas de alto grado. Se presentan los coeficientes de riesgo instant3neo, error standard, intervalos de confianza y valores p para cada variable en un modelo de regresión multivariable de Cox. Se retuvieron para el an3lisis final todos los factores con un valor $p < 0,1$ (IBA1 y RHOA)

Los niveles de expresi3n g3nica de IBA1 y RHOA se consideraron para el an3lisis final de sobrevida, ya que presentaron valores $p < 0,1$ en el an3lisis multivariado de marcadores de UPR – c3ncer.

Para evaluar adecuadamente la capacidad pron3stica de IBA1 y RHOA, se realiz3 un nuevo an3lisis multivariable en el que adem3s se incluyeron todas las variables conocidas como factores pron3sticos que presentaron valores $p < 0,25$ en el an3lisis univariado de nuestra serie de pacientes. Se evaluaron los siguientes factores: edad, sexo, HTA, DM, tabaquismo, KPS postoperatorio, grado de resecci3n tumoral (parcial vs subtotal vs total), grado histol3gico, radioterapia, quimioterapia, mutaciones de TERTp, IDH1/2, amplificaci3n de EGFR y codeleci3n 1p/19q. Los coeficientes, intervalos de confianza y valores de significancia del an3lisis univariado para cada factor pron3stico se presentan en la **Tabla 13**. Los resultados del an3lisis multivariado final se presentan en la **Tabla 14**.

	HR	Std, err	z	P> z	[95% CI]	
Edad	1,026	0,016	1,660	0,097*	0,995	1,058
Sexo	1,591	0,583	1,270	0,205*	0,775	3,262
HTA	1,507	0,549	1,130	0,261	0,738	3,078
DM	0,957	0,438	-0,100	0,923	0,390	2,348
Tabaquismo	1,001	0,367	0,000	0,997	0,488	2,054
KPS postoperatorio						
40	5,554	5,316	1,790	0,073*	0,851	36,256
50	0,452	0,563	-0,640	0,524	0,039	5,190
60	0,953	0,896	-0,050	0,959	0,151	6,011
70	0,365	0,352	-1,050	0,296	0,055	2,413
80	0,896	0,708	-0,140	0,889	0,190	4,216
90	0,309	0,254	-1,430	0,154*	0,061	1,551
100	0,262	0,266	-1,320	0,188*	0,036	1,922
Resección						
Subtotal	0,411	0,237	-1,54	0,124*	0,132	1,27
Total	0,123	0,079	-3,26	0,007*	0,144	0,740
Grado 4	2,401	1,466	1,430	0,152*	0,725	7,948
RT	0,547	0,199	-1,660	0,097*	0,268	1,116
QT	0,467	0,187	-1,900	0,057*	0,213	1,023
IDH 1/2 mutado	0,425	0,230	-1,580	0,114*	0,147	1,227
TERTp mutado	2,697	1,167	2,290	0,022*	1,155	6,296
EGFR amplificado	1,528	0,601	1,080	0,281	0,707	3,301
Co-delección 1p/19q	0,612	0,331	-0,910	0,364	0,212	1,765

Tabla 13. Modelos de regresión univarada para factores clínicos, histopatológicos y genéticos con valor pronóstico conocido de supervivencia global en pacientes con gliomas de alto grado. Se presentan los coeficientes de riesgo instantáneo, error standard, intervalos de confianza y valores p de las regresiones de Cox univariable para cada uno de los factores pronósticos conocidos de supervivencia global en gliomas de alto grado. Se retuvieron para el análisis multivariable todos los factores con un valor $p < 0,25$ (*) = Edad, sexo, KPS40, KPS ≥ 90 , resección total o subtotal, histología grado 4, uso de RT, uso de QT, presencia de mutaciones de IDH1/2, y presencia de mutaciones de TERTp. HTA = Hipertensión arterial; DM = Diabetes Mellitus; KPS = Karnofsky performance status; RT = Radioterapia; QT= Quimioterapia

A partir del modelo completo

$p = 0,8999 \geq 0,1000$ se removió Sexo

$p = 0,8537 \geq 0,1000$ se removió QT

$p = 0,8378 \geq 0,1000$ se removió IDH

$p = 0,2336 \geq 0,1000$ se removió RT

$p = 0,3308 \geq 0,1000$ se removió Resección sub-total

$p = 0,5881 \geq 0,1000$ se removió KPS alto riesgo (KPS = 40)

$p = 0,2932 \geq 0,1000$ se removió Edad

$p = 0,2804 \geq 0,1000$ se removió Grado IV

$p = 0,1600 \geq 0,1000$ se removió RHOA

	HR	Std. err	z	P> z	[95% CI]	
Resección Total	0,267	0,123	-2,86	0,004	0,108	0,659
IBA1	1,448	0,322	1,66	0,100	0,936	2,24
KPS favorable (90-100)	0,357	0,160	-2,30	0,030	0,148	0,86
TERTp mutado	2,686	1,222	2,17	0,029	1,101	6,556

Tabla 14. Modelo final de regresión multivariable para posibles factores pronósticos de

sobrevida global en pacientes con gliomas de alto grado. Se presentan los coeficientes de riesgo

instantáneo, error standard, intervalos de confianza y valores p para cada variable en un modelo

de regresión multivariable de Cox, en el que se consideraron factores pronósticos conocidos con

efecto en esta cohorte de pacientes, y posibles nuevos factores pronósticos. Se conservaron para

el modelo final las variables con valor $p < 0,1$. En este modelo, la resección total (por sobre la

resección subtotal o parcial) y el $KPS \geq 90$ presentaron un coeficiente de riesgo instantáneo < 1 ,

por lo que tendrían un valor pronóstico favorable en pacientes con glioblastoma. La presencia

de mutaciones de TERTp y mayores niveles de expresión de IBA1 presentaron un coeficiente

de riesgo instantáneo > 1 , por lo que se asociarían a una menor sobrevida global.

El modelo de regresión multivariado final identificó 4 variables capaces de explicar la sobrevida

global de los pacientes en nuestra serie de gliomas de alto grado. 2 variables conocidas tuvieron

un cociente de riesgo instantáneo < 1 , por lo que se consideran predictores de mayor sobrevida

(KPS 90-100 (HR=0,357; p= 0,03) y resección tumoral total (HR=0,267; p= 0,004). Se identificó una de las variables conocidas de menor sobrevida global, la presencia de mutaciones de TERTp con un HR=2,686 y un p= 0,029. Finalmente, dentro de los marcadores de UPR – cáncer, IBA1 presentó un HR=1,448 y una significancia estadística limítrofe con un valor p=0,100, que se analizará en la discusión.

10.5.3 Activación de UPR y marcadores de cáncer – relación con otras variables clínicas

Además de los desenlaces clínicos evaluados previamente, se analizó la relación de cada uno de los distintos marcadores de UPR y otros procesos de cáncer con 3 variables clínico-imagenológicas que se consideraron relevantes: (i) la presencia de epilepsia secundaria, (ii) los pacientes de larga sobrevida (>30 meses) y (iii) los volúmenes tumorales preoperatorios.

Al comparar el grupo de pacientes con epilepsia y sin epilepsia, no se encontraron diferencias significativas para ninguno de los marcadores de UPR – cáncer. Al comparar a los pacientes con sobrevida >30 meses versus el resto de los pacientes, no se encontraron diferencias significativas para ninguno de los marcadores de UPR – cáncer. Al analizar la correlación de las distintas variables de UPR – cáncer con los volúmenes tumorales preoperatorios, se identificó una correlación significativa entre los niveles proteicos de BiP y el volumen tumoral preoperatorio de captación de gadolinio en RM, con un coeficiente $r=0,503$ para la correlación de Pearson ($p=0,003$). La representación gráfica de dicha correlación se presenta en la **Figura 27**.

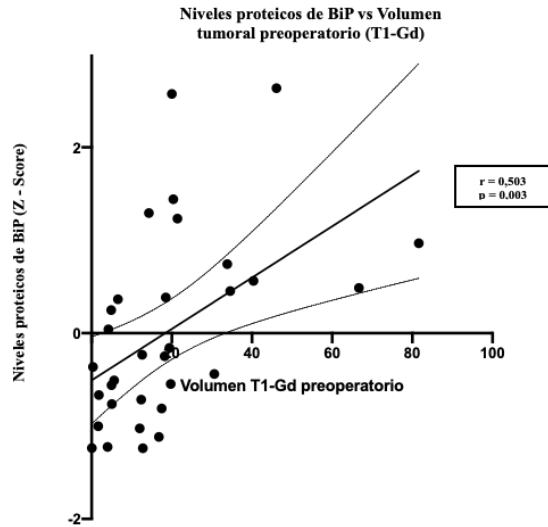


Figura 27. Correlación de niveles proteicos de BiP y volumen tumoral preoperatorio (T1-Gd) en pacientes con gliomas de alto grado. Se evaluó la correlación de niveles proteicos de BiP en tejido tumoral (determinados mediante Western blot) y el volumen tumoral preoperatorio en secuencias T1-Gd de Resonancia Magnética (determinado mediante segmentación manual). Los resultados se presentan en un gráfico de puntos, con una línea de interpolación y líneas de intervalo de confianza 95%. Además, se presenta el coeficiente r y valor p de la correlación de Pearson ($n=32$ pacientes).

11 DISCUSIÓN

11.1 Principales hallazgos del estudio

Los resultados de este estudio muestran una asociación entre la presencia de marcadores genéticos en GBM y la activación de la vía PERK de UPR. Específicamente, la presencia de mutaciones de TERTp y ausencia de mutaciones de IDH se asoció a una mayor expresión de los genes BiP, CHOP y ATF3 (**Figura 19**), los cuales participan en la vía PERK de UPR, mientras que no hubo diferencias en los niveles de XBP1s, que participa en la vía de IRE1 α . También se observó una asociación entre la amplificación de EGFR y menores niveles de SPARC y mayores niveles de fosforilación de eif2 α , sin embargo, la asociación entre estos marcadores es difícil de interpretar en ausencia de diferencias en otros marcadores de UPR. Además, la presencia de mutaciones de TERTp y ausencia de mutaciones de IDH se asociaron con mayores niveles de expresión de genes asociados a invasión tumoral (RHOA y Cyr61), inflamación (CD14) y angiogénesis (CD31) (**Figuras 19 y 20**).

Por otra parte, una mayor activación de UPR se correlacionó fuertemente a la expresión de marcadores específicos de invasión tumoral (RHOA y Cyr61), y de algunos marcadores de angiogénesis (CD31) e inflamación (CD14) (**Figura 15**), lo que es consistente con estudios previos (46,70). Sin embargo, se observaron menores niveles de otros marcadores asociados a angiogénesis (vWF y VEGF) e inflamación (IBA1) (**Figura 16**), por lo que consideramos que los resultados de este estudio son insuficientes para caracterizar la relación entre UPR y angiogénesis e inflamación.

A nivel proteico, se observó una correlación entre niveles de BiP – un sensor general de estrés de RE – con volúmenes tumorales preoperatorios, lo que podría estar asociado a un mayor

crecimiento tumoral. No obstante, el volumen tumoral preoperatorio es una variable dependiente de múltiples factores difíciles de cuantificar, como el tiempo de evolución de la enfermedad, la elocuencia de la región cerebral afectada e incluso el acceso a atención de salud, por lo que no es posible determinar si la relación entre BiP y el volumen tumoral es realmente una asociación independiente.

La relación entre marcadores de UPR a nivel de expresión génica y de proteínas se presenta en una matriz de correlaciones en la **Figura 15**. Contrario a lo esperado inicialmente, no se observó una correlación significativa entre activación de la UPR a nivel de expresión génica y de proteínas, no obstante, esta falta de correlación se podría deber a diferencias en la ubicación exacta del tejido procesado para el análisis de proteínas y mRNA, por lo que en futuros análisis consideraremos el uso de inmunohistoquímica de proteínas de UPR para complementar los resultados obtenidos hasta la fecha. Por otra parte, los marcadores de UPR a nivel de expresión génica están fuertemente correlacionados entre sí, al mismo tiempo que los marcadores de UPR a nivel de proteínas presentan una correlación moderada. Consideramos que estas correlaciones dan validez a la interpretación de nuestros resultados, ya que se presentan alteraciones a nivel de vías de señalización y no de marcadores aislados.

Distintos estudios moleculares en GBM han descrito una activación diferencial de vías de señalización tumoral en poblaciones de distinto origen étnico (71,72), por lo que la caracterización molecular de pacientes chilenos con GBM es relevante para establecer las bases de posibles comparaciones con la población internacional. En la población incluida en este estudio, se observaron mutaciones de TERTp en un 64% del total de pacientes, y en un 70% de los pacientes con tumores de grado 4. La frecuencia de mutaciones de IDH1 fue de un 18% del total de pacientes, y un 12% al considerar solo los pacientes con tumores de grado 4. Por último,

la frecuencia de amplificación de EGFR fue 35% del total de pacientes, y un 40% al considerar solo los pacientes con tumores grado de 4. Estos resultados son similares a lo descrito en la literatura, para este tipo de tumores (8,17,22,73–75). Adicionalmente, se evaluó el impacto de estos marcadores en las curvas de supervivencia, obteniéndose resultados comparables a otros estudios (**Figura 24**) (19,20,28,76), en los que TERTp e IDH1 se asociaron a curvas de supervivencia distintas. Cabe mencionar que en este estudio, la significancia estadística para la prueba de log-rank tuvo un valor p $0,05 < p < 0,1$ para las mutaciones de IDH1, probablemente asociado al bajo número de pacientes con mutaciones de IDH1 ($n=7$).

Los cambios introducidos en la 5ta edición de la clasificación de tumores del SNC de la OMS no modificaron el grado tumoral de ninguno de los pacientes incluidos en este estudio, ya que aquellos pacientes con tumores previamente considerados como astrocitomas anaplásicos no presentaron amplificación de EGFR ni mutaciones de TERTp, sin embargo, en 2 de ellos no se obtuvo la información genética suficiente para establecer con certeza el grado tumoral, por lo que se considerarían como astrocitomas IDHwt grado 3, NOS. Cabe destacar, que a diferencia del sistema de clasificación anterior, actualmente los tumores astrocitarios grado 4 con mutaciones de IDH no se consideran dentro del diagnóstico de GBM, si no como una entidad independiente (7).

De forma complementaria, se abordó el análisis detallado del papel pronóstico de los marcadores de UPR – cáncer a nivel de expresión génica y proteínas, en el que no se demostró un papel pronóstico evidente para ninguno de los marcadores de UPR, y se observó una capacidad pronóstica de significancia estadística limítrofe para el marcador de inflamación tumoral IBA1 ($p=0,100$). La interpretación de la significancia estadística es un tema ampliamente discutido en la literatura (77–79). Brevemente, es importante destacar que la

hipótesis nula en la regresión de Cox considera que no existe una asociación entre el factor predictor y el desenlace, sin embargo, es contraintuitivo postular la hipótesis alternativa de que mayores niveles de IBA1 – un marcador de inflamación tumoral – se asocien a una mayor sobrevida. De esta forma, si la hipótesis alternativa que se evalúa en esta prueba estadística fuera que a mayores niveles de IBA1 hay una menor sobrevida, el valor p en este caso sería equivalente a 0,05.

Otros estudios han evaluado la activación de UPR y sobrevida, y al menos 4 publicaciones han concluido que la activación de UPR tiene un valor pronóstico en GBM (47,48,52,57). Si bien el presente estudio tiene un tamaño muestral inferior a los demás artículos mencionados, este es el único estudio que ha evaluado el valor pronóstico de UPR en el contexto de un análisis multivariable incluyendo variables clínicas relevantes. Si bien, en el análisis realizado por Huang et al. (57) se consideró parcialmente la estrategia descrita en este estudio, el modelo multivariable no consideró la condición clínica de los pacientes ni los tratamientos recibidos (grado de resección tumoral, quimioterapia ni radioterapia), que resultaron ser factores pronósticos relevantes en nuestra serie de pacientes. No es posible descartar que la activación de UPR posea un valor pronóstico independiente en base a nuestros resultados, sin embargo, es necesario dar prioridad al análisis de variables clínicas en futuros estudios, ya que su omisión podría dar lugar a conclusiones incorrectas.

Al examinar los resultados del modelo de regresión multivariable final que utilizamos para el análisis de sobrevida, presentado en la **Tabla 14**, es necesario considerar que en un contexto clínico real – fuera de un ensayo clínico – en el que se incluyen pacientes cuya condición clínica puede limitar los tratamientos complementarios, es posible que el valor pronóstico de variables

independientes como la radioterapia y quimioterapia no sea significativo al analizarlo en el mismo modelo que la condición clínica del paciente, en este caso, el KPS postoperatorio.

11.2 Relevancia de los resultados

El aspecto más relevante de los resultados presentados tiene relación con la posibilidad de implementar nuevas estrategias terapéuticas en pacientes con GBM. Nuestros resultados sugieren que existe un grupo de pacientes caracterizado por la presencia de marcadores genéticos específicos, que presenta una mayor activación de la vía PERK de UPR, en los que una intervención capaz de modular esta vía de señalización podría ser más eficaz. Por otra parte, este estudio confirma lo descrito por otros autores con respecto a la relación entre la activación de UPR y la expresión de distintos genes involucrados en procesos de progresión tumoral (principalmente de invasión tumoral).

Desde un punto de vista clínico, desde Junio de 2021 la determinación de los marcadores genéticos analizados en este estudio tiene una aplicación diagnóstica en el contexto de la 5ta edición de la clasificación OMS para tumores de SNC. El desarrollo de este estudio demuestra que la determinación de estos marcadores genéticos es factible implementar en el corto plazo, y que la población de pacientes chilenos presenta una frecuencia de mutaciones similar a los descrito en la literatura internacional. Más aún, la relevancia clínica de la implementación de este sistema de clasificación es especialmente importante desde la creación del nuevo sistema de clasificación, ya que el uso de estos marcadores permite por primera vez modificar la gradación tumoral. De esta forma, la identificación de mutaciones de TERTp o EGFR en gliomas difusos de grados 2 y 3 sin mutaciones de IDH1/2, permite definir pacientes que requieren un tratamiento complementario de quimioterapia y radioterapia en altas dosis, similar

al de pacientes con GBM. Por otra parte, considerando que el acceso a tratamientos complementarios de alto costo en el sistema público de salud chileno es limitado, es prioritario poder categorizar a los pacientes de forma correcta, para seleccionar de forma oportuna a quienes más se beneficiarán de las distintas terapias.

Con respecto al uso de la secuenciación de IDH como complemento a la inmunodetección de la proteína R132H que se emplea actualmente en la práctica clínica, es importante destacar que la media de edad de los 7 pacientes con mutaciones de IDH1 fue de 48 años. Sólo 2 pacientes con mutaciones de IDH fueron mayores a 55 años (68 y 76 años), edad que habitualmente se utiliza para recomendar la secuenciación de IDH en caso de IHQ negativa (16). La distribución etaria de los pacientes con mutaciones de IDH en este estudio sugiere que el uso clínico de secuenciación de DNA podría ser más relevante de lo que se considera actualmente en pacientes bajo los 55 años en nuestros pacientes. No obstante, desde un punto de vista técnico, la implementación de la IHQ de IDH presentó una sensibilidad y especificidad similar a lo descrito en la literatura (80). No se detectaron falsos positivos de mutaciones de IDH mediante IHQ, y sólo 1 de los 7 pacientes presentó un falso negativo por IHQ, asociado a la secuenciación de la mutación R132S, lo que es esperable dado que la inmunodetección está dirigida exclusivamente a la proteína R132H.

11.3 Proyecciones del estudio

La posibilidad de identificar pacientes con mayor activación de la vía PERK de UPR, mediante el uso de marcadores genéticos que además tienen utilidad clínica, no se limita sólo a la comprensión de los mecanismos de la enfermedad, si no que constituye una oportunidad terapéutica relevante. Durante la última década, se han estudiado distintas alternativas de

modulación de la vía PERK de UPR, que detallaremos a continuación. Existen al menos 3 mecanismos de modulación de la vía PERK de UPR que se encuentran actualmente en etapas preclínicas de estudio: (i) la inhibición directa de la actividad kinasa de PERK, (ii) la inhibición de la fosfatasa eIF2 α y (iii) la inhibición de ATF4.

Inhibición directa de la actividad kinasa de PERK. Los compuestos más estudiados con efecto inhibitorio de la actividad kinasa de pERK son GSK 2606414 y GSK2656157 (81,82). Se trata de inhibidores competitivos de ATP con alta selectividad por PERK, y con propiedades farmacocinéticas favorables para su uso *in vivo* en patologías de SNC. Sin embargo, aún se requieren estudios adicionales para evaluar la tolerancia de estos compuestos en modelos animales, mientras que otros compuestos similares, con mayor especificidad y mejor tolerancia tienen limitaciones farmacocinéticas para la distribución a nivel de SNC, como es el caso de los análogos AMG52 y AMG44 (83). Estos compuestos han sido evaluados en distintos modelos animales de cáncer (81,84), logrando disminución del crecimiento tumoral y menor angiogénesis, sin embargo, no se han evaluado en modelos de GBM hasta la fecha.

Inhibición de la fosfatasa eIF2 α . Se han identificado 3 compuestos capaces de reducir la respuesta celular al estrés de RE mediante la inhibición de la actividad fosfatasas de la proteína eIF2 α . Estos compuestos son el salubrinal (85), guanabenz (86) y Sephin-1 (87), cuyos mecanismos de acción no han sido específicamente descritos, pero poseen un efecto similar a la disminución de la fosforilación de eIF2 α .

Inhibición de ATF4. Un estudio fenotípico de búsqueda de inhibidores selectivos de ATF4 llevó al descubrimiento del inhibidor de respuesta de estrés integrada (ISRIB, por su sigla en inglés), el cual disminuye el efecto inhibitorio sobre la traducción, mediado por ATF4, que

caracteriza a la activación de la UPR (88). El mecanismo en el caso de ISRIB se relaciona con la activación de eIF2B, regulando la estructura terciaria de eIf2 y disminuyendo la traducción de ATF4. La alta potencia y la capacidad de atravesar la barrera hemato-encefálica, han llevado a que múltiples estudios evalúen el uso de ISRIB en otros tipos de cáncer (89,90) y patologías neurodegenerativas en las que la activación de UPR también tendría un rol deletéreo (88,91). Un compuesto descrito recientemente, llamado 2BAct, posee características farmacodinámicas similares a ISRIB, con una farmacocinética que además permite su administración oral, facilitando su uso sistémico (92). La búsqueda de compuestos con efectos similares a ISRIB llevó recientemente a describir el efecto inhibitorio sobre ATF4 de la trazodona, un inhibidor de la recaptación de serotonina aprobado por la FDA, y del dibenzoilmetano, ambos con un perfil de toxicidad muy favorable y buena biodisponibilidad a nivel de SNC, por lo que su efecto modulador de la UPR podría ser evaluado de forma más sencilla en una etapa clínica en el corto plazo (93,94).

A pesar de las múltiples alternativas de modulación de UPR existentes, la farmacocinética y la tolerancia sistémica son limitaciones frecuentes para el avance traslacional de estos compuestos. Una alternativa a estas limitaciones, que ha sido utilizada por el grupo de nuestro colaborador en Francia (Dr. Eric Chevet) para la modulación de la vía IRE1 de UPR, es el desarrollo de terapias de uso local a nivel cerebral, administradas al momento de la cirugía. Esta estrategia de modulación fue evaluada recientemente en un modelo murino de implante ortotópico singénico de GBM, en animales inmunocompetentes, en el que se realizó una resección tumoral guiada por fluorescencia, seguido por la administración del inhibidor de IRE MKC8866 en forma de gel de fibrina-colágeno en el lecho operatorio y posteriormente por un protocolo de quimio y radioterapia concomitante más quimioterapia de mantención (similar al protocolo Stupp de

manejo de pacientes con GBM). Los resultados de dicho estudio, mostraron que el uso de MKC8866 tuvo un efecto adyuvante a la quimio y radioterapia, con mayores tiempos de sobrevivencia de los animales (95)

Con respecto a la implementación de las técnicas utilizadas en este estudio con fines diagnósticos en pacientes con gliomas de alto grado, es importante destacar que existen diferencias relevantes entre los estándares de investigación y estándares clínicos. Durante los últimos años, las plataformas de secuenciación masiva paralela han presentado avances significativos en la cantidad de información genética disponible, disminuyendo tiempos de análisis y costos de operación. Sin embargo, no existen guías específicas para el uso de estas herramientas en cáncer, ya que la validez de los resultados depende de múltiples variables específicas para cada tipo de alteración genética, e incluso específicas para cada patología. Uno de los principales desafíos en la secuenciación masiva paralela es determinar la sensibilidad de la técnica para variantes de baja frecuencia alélica en tejidos de baja celularidad tumoral. En el desarrollo de este estudio, se optimizaron las condiciones para disminuir el riesgo de falsos negativos (extracción de DNA desde tejidos de alta celularidad tumoral, diseño de paneles de secuenciación con alta profundidad de cobertura, y límites bajos de número de lecturas para variantes conocidas, entre otros), sin embargo, la implementación clínica además requiere el uso de controles positivos de las mutaciones de interés, que se pueden utilizar en bajas concentraciones y/o en diluciones seriadas para establecer la sensibilidad y especificidad de la estrategia de secuenciación en un contexto local (59).

11.4 Limitaciones del estudio

A continuación, se enumeran las que consideramos las principales limitaciones de este estudio:

(i) tamaño muestral: el número de pacientes incluidos en el estudio fue calculado para encontrar diferencias de activación de UPR entre distintos grupos genéticos, sin embargo, puede ser insuficiente para la determinación del valor pronóstico de distintos marcadores genéticos y/o relacionados a UPR – cáncer. De la misma forma, pese a que el cálculo inicial se realizó considerando la frecuencia del grupo genético con menor representación, la combinación de TERp-wt e IDHwt fue menos frecuente que lo descrito en la literatura, por lo que no fue posible subdividir a este grupo en base a la amplificación de EGFR, para replicar el sistema de clasificación presentado por Labusiere et al (96). (ii) número de marcadores limitado, en comparación a otros estudios: pese a que se analizaron múltiples marcadores para caracterizar las distintas vías de señalización, no es posible realizar conclusiones categóricas con respecto a mecanismos alternativos de señalización, que podrían tener efectos similares sobre genes blanco. De forma similar, las diferencias encontradas a nivel de activación de UPR entre grupos genéticos podría explicarse de mejor forma por otros marcadores genéticos y/o epigenéticos que no fueron estudiados en esta tesis doctoral. (iii) pérdida de pacientes por muestra tumoral insuficiente: por diversos motivos, relacionados al procesamiento de las muestras y/o factores inherentes a las técnicas de biología molecular utilizadas en este estudio, no se obtuvo la información genética de IDH en 1 paciente, de TERTp en 6 pacientes y de amplificación de EGFR en 5 pacientes. Consideramos que en el futuro, es posible implementar modificaciones al protocolo que permitan asegurar un mayor porcentaje de pacientes con la información genética necesaria. (iv) Cambios de protocolo de manejo de muestra durante el estudio: durante el estudio, se realizó una modificación en el manejo intraoperatorio de las muestras, en post de

obtener resultados de mejor calidad. Sin embargo, al analizar el impacto de este cambio en la variabilidad de los resultados finales, fue necesario excluir 2 marcadores de UPR del análisis de sobrevida.

11.5 Conclusiones

Nuestros resultados muestran por primera vez una asociación entre mutaciones de TERTp e IDH y la activación de la vía PERK de UPR. De esta forma, es posible concluir que la activación de UPR es distinta en distintos grupos genéticos de GBM, por lo que los estudios diseñados para evaluar futuras intervenciones terapéuticas de modulación de UPR deberían considerar este factor durante su planificación. Además, se describe por primera vez la frecuencia de algunas de las mutaciones más relevantes en GBM en una población chilena, y se confirma la asociación entre la presencia de estas mutaciones y el desenlace clínico de los pacientes, medido en tiempos de sobrevida global y libre de progresión. No se observó una asociación entre activación de UPR y desenlaces clínicos en este estudio, sin embargo, no es posible descartar esta asociación, ya que el diseño del estudio podría ser insuficiente para demostrar una asociación de baja magnitud.

12 REFERENCIAS

1. Miller K, Ostrom Q, Kruchko C, Patil N, Tihan T, Cioffi G, et al. Brain and other central nervous system tumor statistics, 2021. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2021 Aug 24 [cited 2021 Sep 6]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34427324/>
2. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol*. 2009;10:459–66.
3. MINSAL M. Primer {Informe} de {Registros} {Poblacionales} de {Cáncer} en {Chile}. {Quinquenio} 2003-2007. [Internet]. 2007 [cited 2016 Aug 15]. Available from: <http://maquetas.ciinet.cl/elgg/file/download/5596>
4. Sinning M, Frelinghuysen M, Gallegos M, Cordova A, Paredes P, Vogel C, et al. Outcome of patients with primary glioblastoma in Chile: Single centre series. *Ecancermedicallscience* [Internet]. 2021 [cited 2021 Sep 6];15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33777177/>
5. Quezada C, Peiñan L, Segura R, Riquelme F, Melo R, Rojas Z D, et al. Glioblastoma multiforme y estudio de la resistencia a la quimioterapia mediada por transportadores {ABC}. *Rev Med Chil* [Internet]. 2011 Apr [cited 2016 Aug 15];139(4):415–24. Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0034-98872011000400001&lng=es&nrm=iso&tlng=es
6. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 {World} {Health} {Organization} {Classification} of {Tumors} of the {Central} {Nervous} {System}: a summary. *Acta Neuropathol*. 2016 Jun;131(6):803–20.
7. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol* [Internet]. 2021 Aug 2 [cited 2021 Sep 6];23(8):1231–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34185076/>
8. Weller M, Felsberg J, Hartmann C, Berger H, Steinbach JP, Schramm J, et al. Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a prospective translational study of the {German} {Glioma} {Network}. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2009 Dec;27(34):5743–50.
9. Xia L, Wu B, Fu Z, Feng F, Qiao E, Li Q, et al. Prognostic role of {IDH} mutations in gliomas: a meta-analysis of 55 observational studies. *Oncotarget*. 2015 Jul;6(19):17354–65.
10. Hartmann C, Hentschel B, Wick W, Capper D, Felsberg J, Simon M, et al. Patients with {IDH1} wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than {IDH1}-mutated glioblastomas, and {IDH1} mutation status accounts for the unfavorable prognostic

- effect of higher age: implications for classification of gliomas. *Acta Neuropathol.* 2010 Dec;120(6):707–18.
11. Nobusawa S, Watanabe T, Kleihues P, Ohgaki H. {IDH1} mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. *Clin Cancer Res An Off J Am Assoc Cancer Res.* 2009 Oct;15(19):6002–7.
 12. Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P, Ohgaki H. {IDH1} mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *Am J Pathol.* 2009 Apr;174(4):1149–53.
 13. Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, et al. Cancer-associated {IDH1} mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature.* 2009 Dec;462(7274):739–44.
 14. Lai A, Kharbanda S, Pope WB, Tran A, Solis OE, Peale F, et al. Evidence for sequenced molecular evolution of {IDH1} mutant glioblastoma from a distinct cell of origin. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2011 Dec;29(34):4482–90.
 15. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. {IDH1} and {IDH2} mutations in gliomas. *N Engl J Med.* 2009 Feb;360(8):765–73.
 16. Nassiri F, Zadeh G, Aldape K. IDH mutation testing in gliomas - Where do we draw the line? [Internet]. Vol. 19, *Neuro-Oncology*. Oxford Academic; 2017 [cited 2021 Sep 6]. p. 1568–9. Available from: <https://academic.oup.com/neuro-oncology/article/19/12/1568/4617103>
 17. Arita H, Narita Y, Fukushima S, Tateishi K, Matsushita Y, Yoshida A, et al. Upregulating mutations in the {TERT} promoter commonly occur in adult malignant gliomas and are strongly associated with total 1p19q loss. *Acta Neuropathol.* 2013 Aug;126(2):267–76.
 18. Killela PJ, Reitman ZJ, Jiao Y, Bettegowda C, Agrawal N, Diaz LA, et al. {TERT} promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Apr;110(15):6021–6.
 19. Labussière M, Di Stefano AL, Gleize V, Boisselier B, Giry M, Mangesius S, et al. {TERT} promoter mutations in gliomas, genetic associations and clinico-pathological correlations. *Br J Cancer.* 2014 Nov;111(10):2024–32.
 20. Simon M, Hosen I, Gousias K, Rachakonda S, Heidenreich B, Gessi M, et al. {TERT} promoter mutations: a novel independent prognostic factor in primary glioblastomas. *Neuro Oncol.* 2015 Jan;17(1):45–52.
 21. Bell RJA, Rube HT, Kreig A, Mancini A, Fouse SD, Nagarajan RP, et al. Cancer. {The} transcription factor {GABP} selectively binds and activates the mutant {TERT} promoter in cancer. *Science.* 2015 May;348(6238):1036–9.
 22. Ceccarelli M, Barthel FP, Malta TM, Sabedot TS, Salama SR, Murray BA, et al. Molecular {Profiling} {Reveals} {Biologically} {Discrete} {Subsets} and {Pathways} of {Progression} in {Diffuse} {Glioma}. *Cell.* 2016 Jan;164(3):550–63.

23. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, et al. Integrated {Genomic} {Analysis} {Identifies} {Clinically} {Relevant} {Subtypes} of {Glioblastoma} {Characterized} by {Abnormalities} in {PDGFRA}, {IDH1}, {EGFR}, and {NF1}. *Cancer Cell* [Internet]. 2010 Jan [cited 2016 Aug 28];17(1):98–110. Available from: /cancer-cell/abstract/S1535-6108(09)00432-2
24. Del Vecchio CA, Giacomini CP, Vogel H, Jensen KC, Florio T, Merlo A, et al. {EGFRvIII} gene rearrangement is an early event in glioblastoma tumorigenesis and expression defines a hierarchy modulated by epigenetic mechanisms. *Oncogene*. 2013 May;32(21):2670–81.
25. Endres NF, Das R, Smith AW, Arkhipov A, Kovacs E, Huang Y, et al. Conformational {Coupling} across the {Plasma} {Membrane} in {Activation} of the {EGF} {Receptor}. *Cell* [Internet]. 2013 Jan [cited 2016 Aug 29];152(3):543–56. Available from: /cell/abstract/S0092-8674(12)01554-1
26. Talasila KM, Soentgerath A, Euskirchen P, Rosland G V, Wang J, Huszthy PC, et al. {EGFR} wild-type amplification and activation promote invasion and development of glioblastoma independent of angiogenesis. *Acta Neuropathol*. 2013 May;125(5):683–98.
27. Batchelor TT, Betensky RA, Esposito JM, Pham L-DD, Dorfman M V, Piscatelli N, et al. Age-dependent prognostic effects of genetic alterations in glioblastoma. *Clin Cancer Res An Off J Am Assoc Cancer Res*. 2004 Jan;10(1 Pt 1):228–33.
28. Eckel-Passow JE, Lachance DH, Molinaro AM, Walsh KM, Decker PA, Sicotte H, et al. Glioma {Groups} {Based} on 1p/19q, {IDH}, and {TERT} {Promoter} {Mutations} in {Tumors}. *N Engl J Med*. 2015 Jun;372(26):2499–508.
29. Hetz C, Axten JM, Patterson JB. Pharmacological targeting of the unfolded protein response for disease intervention [Internet]. Vol. 15, *Nature Chemical Biology*. *Nat Chem Biol*; 2019 [cited 2021 Sep 6]. p. 764–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31320759/>
30. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. Vol. 144, *Cell*. 2011. p. 646–74.
31. Oakes SA. Endoplasmic Reticulum Stress Signaling in Cancer Cells [Internet]. Vol. 190, *American Journal of Pathology*. *Am J Pathol*; 2020 [cited 2021 Sep 6]. p. 934–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32112719/>
32. Kozutsumi Y, Segal M, Normington K, Gething MJ, Sambrook J. The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature*. 1988 Mar;332(6163):462–4.
33. Ma Y, Hendershot LM. The role of the unfolded protein response in tumour development: friend or foe? *Nat Rev Cancer*. 2004 Dec;4(12):966–77.
34. Urra H, Dufey E, Avril T, Chevet E, Hetz C. Endoplasmic {Reticulum} {Stress} and the {Hallmarks} of {Cancer}. *Trends in Cancer* [Internet]. 2016 May [cited 2017 Apr

- 17];2(5):252–62. Available from: [http://www.cell.com/trends/cancer/abstract/S2405-8033\(16\)30002-4](http://www.cell.com/trends/cancer/abstract/S2405-8033(16)30002-4)
35. Wang M, Kaufman RJ. The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. *Nat Rev Cancer*. 2014 Sep;14(9):581–97.
 36. Dejeans N, Manié S, Hetz C, Bard F, Hupp T, Agostinis P, et al. Addicted to secrete - novel concepts and targets in cancer therapy. *Trends Mol Med*. 2014 May;20(5):242–50.
 37. Hetz C, Zhang K, Kaufman RJ. Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response [Internet]. Vol. 21, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 2020 [cited 2021 Sep 6]. p. 421–38. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32457508/>
 38. Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of {BiP} and {ER} stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol*. 2000 Jun;2(6):326–32.
 39. Kimata Y, Kimata YI, Shimizu Y, Abe H, Farcasanu IC, Takeuchi M, et al. Genetic evidence for a role of {BiP}/{Kar2} that regulates {Ire1} in response to accumulation of unfolded proteins. *Mol Biol Cell*. 2003 Jun;14(6):2559–69.
 40. Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*. 2011 Nov;334(6059):1081–6.
 41. Hetz C, Martinon F, Rodriguez D, Glimcher LH. The unfolded protein response: integrating stress signals through the stress sensor {IRE1 α }. *Physiol Rev*. 2011 Oct;91(4):1219–43.
 42. Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, et al. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell*. 2000 Nov;6(5):1099–108.
 43. Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calton M, et al. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell*. 2003 Mar;11(3):619–33.
 44. Ku HC, Cheng CF. Master Regulator Activating Transcription Factor 3 (ATF3) in Metabolic Homeostasis and Cancer [Internet]. Vol. 11, *Frontiers in Endocrinology*. 2020 [cited 2021 Sep 8]. p. 556. Available from: www.frontiersin.org
 45. Brooks AC, Guo Y, Singh M, McCracken J, Xuan YT, Srivastava S, et al. Endoplasmic reticulum stress-dependent activation of ATF3 mediates the late phase of ischemic preconditioning. *Curr Ther Res - Clin Exp* [Internet]. 2014 Dec 1 [cited 2021 Sep 9];76:138–47. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25151953/>
 46. Drogat B, Auguste P, Nguyen DT, Bouche-careilh M, Pineau R, Nalbantoglu J, et al. {IRE1} {Signaling} {Is} {Essential} for {Ischemia}-{Induced} {Vascular} {Endothelial} {Growth} {Factor}-{A} {Expression} and {Contributes} to {Angiogenesis} and {Tumor} {Growth} {In} vivo. *Cancer Res* [Internet]. 2007 Jul [cited

2016 Oct 23];67(14):6700–7. Available from:
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/67/14/6700>

47. Pluquet O, Dejeans N, Bouchecareilh M, Lhomond S, Pineau R, Higa A, et al. Posttranscriptional regulation of {PER1} underlies the oncogenic function of {IRE α }. *Cancer Res*. 2013 Aug;73(15):4732–43.
48. Lhomond S, Avril T, Dejeans N, Voutetakis K, Doultinos D, McMahon M, et al. Dual {IRE1} {RNase} functions dictate glioblastoma development. *EMBO Mol Med*. 2018;10(3).
49. Epple LM, Dodd RD, Merz AL, Dechkovskaia AM, Herring M, Winston BA, et al. Induction of the unfolded protein response drives enhanced metabolism and chemoresistance in glioma cells. *PLoS One*. 2013;8(8):e73267.
50. Lee HK, Xiang C, Cazacu S, Finniss S, Kazimirsky G, Lemke N, et al. {GRP78} is overexpressed in glioblastomas and regulates glioma cell growth and apoptosis. *Neuro Oncol*. 2008 Jun;10(3):236–43.
51. Hou X, Liu Y, Liu H, Chen X, Liu M, Che H, et al. {PERK} silence inhibits glioma cell growth under low glucose stress by blockage of p-{AKT} and subsequent {HK2}'s mitochondria translocation. *Sci Rep*. 2015 Mar;5:9065.
52. Peñaranda-Fajardo NM, Meijer C, Liang Y, Dijkstra BM, Aguirre-Gamboa R, den Dunnen WFA, et al. ER stress and UPR activation in glioblastoma: identification of a noncanonical PERK mechanism regulating GBM stem cells through SOX2 modulation. *Cell Death Dis* [Internet]. 2019 Oct 1 [cited 2021 Sep 6];10(10). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31534165/>
53. Goplen D, Wang J, Enger PØ, Tysnes BB, Terzis AJA, Laerum OD, et al. Protein disulfide isomerase expression is related to the invasive properties of malignant glioma. *Cancer Res*. 2006 Oct;66(20):9895–902.
54. Zou H, Wen C, Peng Z, Shao Y-Y, Hu L, Li S, et al. {P4HB} and {PDIA3} are associated with tumor progression and therapeutic outcome of diffuse gliomas. *Oncol Rep*. 2018 Feb;39(2):501–10.
55. Liu Y, Ji W, Shergalis A, Xu J, Delaney AM, Calcaterra A, et al. Activation of the unfolded protein response via inhibition of protein disulfide isomerase decreases the capacity for {DNA} repair to sensitize glioblastoma to radiotherapy. *Cancer Res* [Internet]. 2019 Jan [cited 2019 Jun 9];canres.2540.2018. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/early/2019/04/17/0008-5472.CAN-18-2540>
56. Redzic JS, Gomez JD, Hellwinkel JE, Anchordoquy TJ, Graner MW. Proteomic analyses of brain tumor cell lines amidst the unfolded protein response. *Oncotarget*. 2016 Jul;7(30):47831–47.
57. Huang R, Li G, Wang K, Wang Z, Zeng F, Hu H, et al. Comprehensive Analysis of the Clinical and Biological Significances of Endoplasmic Reticulum Stress in Diffuse

- Gliomas. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2021 Jul 9 [cited 2021 Sep 6];9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34307339/>
58. Wen PY, Macdonald DR, Reardon DA, Cloughesy TF, Sorensen AG, Galanis E, et al. Updated response assessment criteria for high-grade gliomas: response assessment in neuro-oncology working group. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2010 Apr;28(11):1963–72.
 59. Petrackova A, Vasinek M, Sedlarikova L, Dyskova T, Schneiderova P, Novosad T, et al. Standardization of Sequencing Coverage Depth in NGS: Recommendation for Detection of Clonal and Subclonal Mutations in Cancer Diagnostics. *Front Oncol*. 2019 Sep 4;9:851.
 60. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* [Internet]. 2012 Apr [cited 2021 Sep 6];9(4):357–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22388286/>
 61. Li H. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics* [Internet]. 2011 Nov [cited 2021 Sep 6];27(21):2987–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21903627/>
 62. Petrackova A, Vasinek M, Sedlarikova L, Dyskova T, Schneiderova P, Novosad T, et al. Standardization of Sequencing Coverage Depth in NGS: Recommendation for Detection of Clonal and Subclonal Mutations in Cancer Diagnostics. *Front Oncol* [Internet]. 2019 Sep 13 [cited 2021 Nov 4];9(SUPPL11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24564169/>
 63. Oliveira C, Wolf T. CNVPanelizer: Reliable CNV detection in targeted sequencing applications. R package version 1.23.0. [Internet]. 2020 [cited 2021 Sep 6]. p. 1–8. Available from: <https://www.bioconductor.org/packages/devel/bioc/vignettes/CNVPanelizer/inst/doc/CNVPanelizer.pdf>
 64. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, et al. The cBio Cancer Genomics Portal: An open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov* [Internet]. 2012 May 1 [cited 2021 Sep 6];2(5):401–4. Available from: <https://cancerdiscovery.aacrjournals.org/content/2/5/401>
 65. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal* [Internet]. 2013 Apr 2 [cited 2021 Sep 6];6(269). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23550210/>
 66. Riedel G, Rüdrieh U, Fekete-Drimusz N, Manns MP, Vondran FWR, Bock M. An extended Δ CT-method facilitating normalisation with multiple reference genes suited for quantitative RT-PCR analyses of human hepatocyte-like cells. *PLoS One* [Internet]. 2014 Mar 21 [cited 2021 Sep 6];9(3):e93031. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0093031>

67. Jo J, Choi S, Oh J, Lee SG, Choi SY, Kim KK, et al. Conventionally used reference genes are not outstanding for normalization of gene expression in human cancer research. *BMC Bioinformatics* [Internet]. 2019 May 29 [cited 2021 Sep 6];20(10):13–21. Available from: <https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12859-019-2809-2>
68. Bonham-Carter O, Thu YM. Systematic normalization with multiple housekeeping genes for the discovery of genetic dependencies in cancer. *bioRxiv* [Internet]. 2020 Jan 31 [cited 2021 Sep 6];2020.01.29.925651. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.01.29.925651v1>
69. Broom BM, Ryan MC, Stucky M, Wakefield C, Melott JM, Akbani R, et al. Interactive Clustered Heat Map Builder: An easy web-based tool for creating sophisticated clustered heat maps. *F1000Research* [Internet]. 2020 [cited 2021 Sep 6];8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32269754/>
70. Auf G, Jabouille A, Guérit S, Pineau R, Delugin M, Bouchecareilh M, et al. Inositol-requiring enzyme 1 α is a key regulator of angiogenesis and invasion in malignant glioma. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2010 Aug [cited 2016 Oct 23];107(35):15553–8. Available from: <http://www.pnas.org/content/107/35/15553>
71. Chen P, Aldape K, Wiencke JK, Kelsey KT, Miike R, Davis RL, et al. Ethnicity delineates different genetic pathways in malignant glioma. *Cancer Res*. 2001 May;61(10):3949–54.
72. Wiencke JK, Aldape K, McMillan A, Wiemels J, Moghadassi M, Miike R, et al. Molecular features of adult glioma associated with patient race/ethnicity, age, and a polymorphism in O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase. *Cancer Epidemiol Biomarkers & Prev A Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored by Am Soc Prev Oncol*. 2005 Jul;14(7):1774–83.
73. Sanson M, Marie Y, Paris S, Idhah A, Laffaire J, Ducray F, et al. Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2009 Sep;27(25):4150–4.
74. Zacher A, Kaulich K, Stepanow S, Wolter M, Köhrer K, Felsberg J, et al. Molecular Diagnostics of Gliomas Using Next Generation Sequencing of a Glioma-Tailored Gene Panel. *Brain Pathol*. 2017;27(2):146–59.
75. Brennan CW, Verhaak RGW, McKenna A, Campos B, Nounshmehr H, Salama SR, et al. The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. *Cell* [Internet]. 2013 Oct [cited 2016 Aug 28];155(2):462–77. Available from: [/cell/abstract/S0092-8674\(13\)01208-7](http://cell/abstract/S0092-8674(13)01208-7)
76. Cancer Genome Atlas Research Network, Brat DJ, Verhaak RGW, Aldape KD, Yung WKA, Salama SR, et al. Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *N Engl J Med*. 2015 Jun;372(26):2481–98.
77. Ranganathan P, Buyse M, Pramesh C. Common pitfalls in statistical analysis: “P” values,

- statistical significance and confidence intervals. *Perspect Clin Res* [Internet]. 2015 [cited 2021 Sep 9];6(2):116. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25878958/>
78. Lytsy P. P in the right place: Revisiting the evidential value of P-values [Internet]. Vol. 11, *Journal of Evidence-Based Medicine. J Evid Based Med*; 2018 [cited 2021 Sep 9]. p. 288–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30398018/>
 79. Steyerberg EW, Van Calster B. Redefining significance and reproducibility for medical research: A plea for higher P-value thresholds for diagnostic and prognostic models [Internet]. Vol. 50, *European Journal of Clinical Investigation. Eur J Clin Invest*; 2020 [cited 2021 Sep 9]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32281648/>
 80. Zou Y, Bai HX, Wang Z, Yang L. Comparison of immunohistochemistry and DNA sequencing for the detection of IDH1 mutations in gliomas [Internet]. Vol. 17, *Neuro-Oncology. Oxford Academic*; 2015 [cited 2021 Nov 8]. p. 477–8. Available from: <https://academic.oup.com/neuro-oncology/article/17/3/477/2280745>
 81. Axten JM, Medina JR, Feng Y, Shu A, Romeril SP, Grant SW, et al. Discovery of 7-methyl-5-(1-({3-(trifluoromethyl)phenyl}acetyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-amine (GSK2606414), a potent and selective first-in-class inhibitor of protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase (PERK). *J Med Chem* [Internet]. 2012 Aug 23 [cited 2021 Sep 9];55(16):7193–207. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22827572/>
 82. Axten JM, Romeril SP, Shu A, Ralph J, Medina JR, Feng Y, et al. Discovery of GSK2656157: An optimized PERK inhibitor selected for preclinical development. *ACS Med Chem Lett* [Internet]. 2013 Oct 10 [cited 2021 Sep 9];4(10):964–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24900593/>
 83. Smith AL, Andrews KL, Beckmann H, Bellon SF, Beltran PJ, Booker S, et al. Discovery of 1 H -pyrazol-3(2 H)-ones as potent and selective inhibitors of protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK). *J Med Chem* [Internet]. 2015 Feb 12 [cited 2021 Sep 9];58(3):1426–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25587754/>
 84. Atkins C, Liu Q, Minthorn E, Zhang SY, Figueroa DJ, Moss K, et al. Characterization of a novel PERK kinase inhibitor with antitumor and antiangiogenic activity. *Cancer Res* [Internet]. 2013 Mar 15 [cited 2021 Nov 9];73(6):1993–2002. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23333938/>
 85. Boyce M, Bryant KF, Jousse C, Long K, Harding HP, Scheuner D, et al. A selective inhibitor of eIF2alpha dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science* [Internet]. 2005 Feb 11 [cited 2021 Nov 9];307(5711):935–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15705855/>
 86. Tsaytler P, Harding HP, Ron D, Bertolotti A. Selective inhibition of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 restores proteostasis. *Science* [Internet]. 2011 Apr 1 [cited 2021 Nov 9];332(6025):91–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21385720/>
 87. Das I, Krzyzosiak A, Schneider K, Wrabetz L, D'Antonio M, Barry N, et al. Preventing

proteostasis diseases by selective inhibition of a phosphatase regulatory subunit. *Science* [Internet]. 2015 Apr 10 [cited 2021 Nov 9];348(6231):239–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25859045/>

88. Halliday M, Radford H, Sekine Y, Moreno J, Verity N, Le Quesne J, et al. Partial restoration of protein synthesis rates by the small molecule ISRIB prevents neurodegeneration without pancreatic toxicity. *Cell Death Dis* 2015 63 [Internet]. 2015 Mar 5 [cited 2021 Nov 9];6(3):e1672–e1672. Available from: <https://www.nature.com/articles/cddis201549>
89. Palam LR, Gore J, Craven KE, Wilson JL, Korc M. Integrated stress response is critical for gemcitabine resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cell Death Dis* [Internet]. 2015 Oct 1 [cited 2021 Nov 9];6(10). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26469962/>
90. Nguyen HG, Conn CS, Kye Y, Xue L, Forester CM, Cowan JE, et al. Development of a stress response therapy targeting aggressive prostate cancer. *Sci Transl Med* [Internet]. 2018 May 2 [cited 2021 Nov 9];10(439). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29720449/>
91. Larhammar M, Huntwork-Rodriguez S, Jiang Z, Solanoy H, Ghosh AS, Wang B, et al. Dual leucine zipper kinase-dependent PERK activation contributes to neuronal degeneration following insult. *Elife*. 2017 Apr 25;6.
92. Wong YL, Lebon L, Basso AM, Kohlhaas KL, Nikkel AL, Robb HM, et al. eIF2B activator prevents neurological defects caused by a chronic integrated stress response. *Elife*. 2019 Jan 1;8.
93. Halliday M, Radford H, Zents KAM, Molloy C, Moreno JA, Verity NC, et al. Repurposed drugs targeting eIF2 α -P-mediated translational repression prevent neurodegeneration in mice. *Brain* [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2021 Nov 9];140(6):1768–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28430857/>
94. Wood H. Halting neurodegeneration — are repurposed drugs the answer? *Nat Rev Neurol* 2017 136 [Internet]. 2017 May 5 [cited 2021 Nov 9];13(6):317–317. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrneurol.2017.71>
95. Le Reste PJ, Pineau R, Voutetakis K, Samal J, Jégou G, Lhomond S, et al. Local intracerebral inhibition of IRE1 by MKC8866 sensitizes glioblastoma to irradiation/chemotherapy in vivo. *Cancer Lett* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2021 Sep 6];494:73–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32882336/>
96. Labussière M, Boisselier B, Mokhtari K, Di Stefano A-L, Rahimian A, Rossetto M, et al. Combined analysis of {TERT}, {EGFR}, and {IDH} status defines distinct prognostic glioblastoma classes. *Neurology*. 2014 Sep;83(13):1200–6.

TABLAS SUPLEMENTARIAS

Tabla Suplementaria 1. *Protocolo de generación de librerías Ampliseq.*

PROTOCOLO AMPLISEQ	
AMPLIFICACIÓN DE TARGETS	Llevar 10ng de DNA a 6,75µL con buffer LTE Agregar 4,5uL de HIFI mix Mezclar 2,5uL con cada pool de primers Termociclador: 21 ciclos de amplificación standard
DIGESTIÓN PARCIAL	Mezclar productos de PCR y agregar 2uL de FUPA a cada pocillo Termociclador a 50°C por 10 minutos; 55°C por 10 minutos; 62°C por 10 minutos
LIGAR ADAPTADORES	Agregar 4uL de switch solution + 2uL de adaptadores + 2uL de ligasa Termociclador a 22°C por 30 minutos; 68°C por 5 minutos; 72°C por 5 minutos
LIMPIEZA 1	Agregar beads magnéticas de DNA 1X Limpieza Standard
ENRIQUECER FRAGMENTOS DE DNA	Agregar 2,5 µL de primers de amplificación + 22,5 µL de mix de amplificación Termociclador a 95°C durante 3 minutos; luego 9X (98°C 15" - 64°C 60")
LIMPIAR DNA AMPLIFICADO	Agregar beads magnéticas de DNA 0,7X - lavado standard con captura de sobrenadante Agregar beads magnéticas de DNA 0,8X - lavado standard con captura de precipitado Resuspender en volumen final de 17uL

Tabla Suplementaria 2. Protocolo de generación de librerías Truseq

PROTOCOLO TRUSEQ	
DENATURACIÓN DE DNA	Llevar 25-100ng de DNA a un volumen de 24 µL con buffer de resuspensión (RSB) Transferir a placa de PCR. Precaentar Termociclador a 95°C y denaturar por 5 minutos.
REPARACIÓN DE EXTREMOS	Agregar 16 µL de ERP2 Termociclador a 30°C durante 30 minutos.
REMOVER FRAGMENTOS PEQUEÑOS DE DNA	Beads magnéticas de DNA en proporción 1,5:1 Limpieza Standard
ADENILACIÓN DE EXTREMOS 3'	Agregue 7,5 µL de ATL y mezcle bien. Termociclador: 37°C por 30 minutos; 70°C durante 5 minutos.
LIGAR ADAPTADORES	Agregar: RSB 1,5 µL, ligasa 1,5uL, adaptador DNA 1,5uL Termociclador a 30°C durante 10 minutos Agregar 3 µL de solución stop
LIMPIAR FRAGMENTOS LIGADOS	Doble limpieza con beads magnéticas de DNA 1X Limpieza Standard Resuspensión en 10uL de buffer de resuspensión
ENRIQUECER FRAGMENTOS DE DNA	Agregar 2 µL de primers de amplificación + 8 µL PCR mix Termociclador a 95 ° C durante 3 minutos; luego 15X (98°C 20" - 60°C 15" - 72°C 30"); 72°C por 5 minutos.
LIMPIAR DNA AMPLIFICADO	Beads magnéticas de DNA en proporción 0,8:1 Resuspender en 16uL finales

Tabla Suplementaria N°3. Coordenadas de amplicones diseñados para librerías Ampliseq, sobre genes de interés IDH1, IDH2 y EGFR.

Amplicon ID	Nombre del Amplicón	Cromosoma	Inicio	Final
AMPL656451	IDH1_AMPL1480345645	chr2	208248213	208248285
AMPL656452	IDH1_AMPL1480345645	chr2	208248274	208248341
AMPL656453	IDH1_AMPL1480345645	chr2	208248326	208248406
AMPL368995	IDH1_AMPL1480345645	chr2	208248397	208248485
AMPL368171	IDH1_AMPL1480345645	chr2	208248484	208248563
AMPL368172	IDH1_AMPL1480345645	chr2	208248552	208248631
AMPL368173	IDH1_AMPL1480345645	chr2	208248603	208248677
AMPL658497	EGFR_AMPL3659127744	chr7	55019238	55019338
AMPL30339	EGFR_AMPL3659127744	chr7	55019255	55019353
AMPL30340	EGFR_AMPL3659127744	chr7	55019380	55019473
AMPL865449	EGFR_AMPL3659127744	chr7	55019383	55019487
AMPL656522	EGFR_AMPL387846213	chr7	55142185	55142259
AMPL656523	EGFR_AMPL387846213	chr7	55142237	55142317
AMPL30327	EGFR_AMPL387846213	chr7	55142308	55142391
AMPL30328	EGFR_AMPL387846213	chr7	55142383	55142466
AMPL656532	EGFR_AMPL387846213	chr7	55142455	55142523
AMPL865444	EGFR_AMPL387801342	chr7	55143248	55143344
AMPL656508	EGFR_AMPL387801342	chr7	55143337	55143413
AMPL656509	EGFR_AMPL387801342	chr7	55143402	55143476
AMPL656510	EGFR_AMPL387801342	chr7	55143465	55143555
AMPL30329	EGFR_AMPL387954713	chr7	55146535	55146627
AMPL31746	EGFR_AMPL387954713	chr7	55146616	55146712
AMPL658500	EGFR_AMPL387954713	chr7	55146701	55146784
AMPL656496	EGFR_AMPL387954713	chr7	55146773	55146844
AMPL656542	EGFR_AMPL3476528923	chr7	55151182	55151267
AMPL656543	EGFR_AMPL3476528923	chr7	55151256	55151344
AMPL30293	EGFR_AMPL3476528923	chr7	55151323	55151402
AMPL865441	EGFR_AMPL3659095702	chr7	55152458	55152551
AMPL865442	EGFR_AMPL3659095702	chr7	55152551	55152647
AMPL31744	EGFR_AMPL1484574703,	chr7	55152632	55152718
AMPL658503	EGFR_AMPL3659095702,	chr7	55152673	55152751
AMPL30302	EGFR_AMPL3659119671	chr7	55153932	55154020
AMPL30303	EGFR_AMPL3659119671	chr7	55154009	55154106
AMPL30304	EGFR_AMPL3659119671	chr7	55154078	55154171
AMPL30305	EGFR_AMPL3659119671	chr7	55154127	55154221

AMPL656497	EGFR_AMPL387913561	chr7	55155624	55155717
AMPL656498	EGFR_AMPL387913561	chr7	55155708	55155796
AMPL30296	EGFR_AMPL387913561	chr7	55155738	55155828
AMPL30297	EGFR_AMPL387913561	chr7	55155817	55155915
AMPL30298	EGFR_AMPL387913561	chr7	55155904	55156000
AMPL656539	EGFR_AMPL387830212	chr7	55156406	55156494
AMPL540285	EGFR_AMPL387830212	chr7	55156483	55156558
AMPL656540	EGFR_AMPL387830212	chr7	55156527	55156602
AMPL865437	EGFR_AMPL387830212	chr7	55156591	55156664
AMPL865438	EGFR_AMPL387830212	chr7	55156624	55156711
AMPL865439	EGFR_AMPL387830212	chr7	55156697	55156782
AMPL865440	EGFR_AMPL387830212	chr7	55156774	55156859
AMPL656518	EGFR_AMPL387830212	chr7	55156848	55156927
AMPL30261	EGFR_AMPL388001907	chr7	55157590	55157662
AMPL30262	EGFR_AMPL388001907	chr7	55157651	55157742
AMPL30263	EGFR_AMPL388001907	chr7	55157731	55157803
AMPL30277	EGFR_AMPL3659139277	chr7	55160054	55160143
AMPL30278	EGFR_AMPL3659139277	chr7	55160132	55160207
AMPL30279	EGFR_AMPL3659139277	chr7	55160194	55160272
AMPL30280	EGFR_AMPL3659139277	chr7	55160240	55160327
AMPL30281	EGFR_AMPL3659139277	chr7	55160317	55160400
AMPL31736	EGFR_AMPL387933223	chr7	55161412	55161509
AMPL31737	EGFR_AMPL387933223	chr7	55161498	55161599
AMPL31738	EGFR_AMPL387933223	chr7	55161588	55161665
AMPL656476	EGFR_AMPL387933223	chr7	55161628	55161713
AMPL30275	EGFR_AMPL3477875782	chr7	55163679	55163765
AMPL47950	EGFR_AMPL3477875782	chr7	55163751	55163834
AMPL656483	EGFR_AMPL3477875782	chr7	55163774	55163868
AMPL30334	EGFR_AMPL387807058	chr7	55165208	55165283
AMPL30335	EGFR_AMPL387807058	chr7	55165272	55165350
AMPL30336	EGFR_AMPL387807058	chr7	55165316	55165400
AMPL656502	EGFR_AMPL387807058	chr7	55165387	55165463
AMPL656503	EGFR_AMPL387807058	chr7	55165453	55165537
AMPL656484	EGFR_AMPL387833352	chr7	55168356	55168424
AMPL656485	EGFR_AMPL387833352	chr7	55168410	55168475
AMPL656486	EGFR_AMPL387833352	chr7	55168441	55168519
AMPL30246	EGFR_AMPL387833352	chr7	55168508	55168569
AMPL656515	EGFR_AMPL388799126	chr7	55170142	55170226
AMPL656516	EGFR_AMPL388799126	chr7	55170206	55170294

AMPL30265	EGFR_AMPL388799126	chr7	55170283	55170369
AMPL30266	EGFR_AMPL388799126	chr7	55170358	55170446
AMPL30267	EGFR_AMPL388799126	chr7	55170444	55170540
AMPL406048	EGFR_AMPL388799126	chr7	55170529	55170626
AMPL406049	EGFR_AMPL388799126	chr7	55170626	55170720
AMPL406054	EGFR_AMPL905621524	chr7	55171037	55171108
AMPL656491	EGFR_AMPL905621524	chr7	55171046	55171118
AMPL30247	EGFR_AMPL905621524	chr7	55171142	55171222
AMPL656489	EGFR_AMPL905621524	chr7	55171211	55171304
AMPL30299	EGFR_AMPL3659173907	chr7	55172894	55172986
AMPL31745	EGFR_AMPL3659173907	chr7	55172983	55173083
AMPL30301	EGFR_AMPL3659173907	chr7	55173097	55173194
AMPL30269	EGFR_AMPL387987361	chr7	55173869	55173961
AMPL30270	EGFR_AMPL387987361	chr7	55173950	55174031
AMPL30271	EGFR_AMPL387987361	chr7	55174018	55174106
AMPL656519	EGFR_AMPL387987361	chr7	55174060	55174143
AMPL656536	EGFR_AMPL388017756	chr7	55174592	55174673
AMPL656537	EGFR_AMPL388017756	chr7	55174659	55174735
AMPL656538	EGFR_AMPL388017756	chr7	55174724	55174800
AMPL865433	EGFR_AMPL388017756	chr7	55174789	55174871
AMPL656488	EGFR_AMPL388017756	chr7	55174866	55174946
AMPL31739	EGFR_AMPL387834346	chr7	55181203	55181293
AMPL31740	EGFR_AMPL387834346	chr7	55181281	55181371
AMPL31741	EGFR_AMPL387834346	chr7	55181365	55181451
AMPL658498	EGFR_AMPL387834346	chr7	55181440	55181522
AMPL656471	EGFR_AMPL388603670	chr7	55191589	55191679
AMPL30322	EGFR_AMPL388603670	chr7	55191675	55191769
AMPL30323	EGFR_AMPL388603670	chr7	55191715	55191799
AMPL30324	EGFR_AMPL388603670	chr7	55191788	55191869
AMPL30325	EGFR_AMPL388603670	chr7	55191858	55191935
AMPL30289	EGFR_AMPL387826935	chr7	55192713	55192792
AMPL30290	EGFR_AMPL387826935	chr7	55192778	55192854
AMPL30291	EGFR_AMPL387826935	chr7	55192833	55192915
AMPL656533	EGFR_AMPL1134754150	chr7	55198570	55198649
AMPL30318	EGFR_AMPL1134754150	chr7	55198638	55198724
AMPL30319	EGFR_AMPL1134754150	chr7	55198702	55198779
AMPL30320	EGFR_AMPL2663022930	chr7	55198768	55198856
AMPL30321	EGFR_AMPL2663022930	chr7	55198845	55198936
AMPL656480	EGFR_AMPL388736214	chr7	55200178	55200267

AMPL47948	EGFR_AMPL388736214	chr7	55200256	55200347
AMPL865432	EGFR_AMPL388736214	chr7	55200337	55200432
AMPL30274	EGFR_AMPL388736214	chr7	55200425	55200513
AMPL656493	EGFR_AMPL387970730	chr7	55201089	55201156
AMPL656494	EGFR_AMPL387970730	chr7	55201145	55201225
AMPL656495	EGFR_AMPL387970730	chr7	55201187	55201271
AMPL47943	EGFR_AMPL387970730	chr7	55201260	55201349
AMPL47944	EGFR_AMPL387970730	chr7	55201294	55201375
AMPL656487	EGFR_AMPL387970730	chr7	55201364	55201434
AMPL656528	EGFR_AMPL387805180	chr7	55201654	55201732
AMPL656529	EGFR_AMPL387805180	chr7	55201713	55201786
AMPL30256	EGFR_AMPL387805180	chr7	55201774	55201845
AMPL656513	EGFR_AMPL387805180	chr7	55201808	55201879
AMPL656514	EGFR_AMPL387805180	chr7	55201879	55201949
AMPL30252	EGFR_AMPL2515432765	chr7	55202452	55202545
AMPL30253	EGFR_AMPL2515432765	chr7	55202535	55202633
AMPL30254	EGFR_AMPL2515432765	chr7	55202559	55202657
AMPL656506	EGFR_AMPL388589929	chr7	55205158	55205240
AMPL656507	EGFR_AMPL388589929	chr7	55205229	55205312
AMPL30307	EGFR_AMPL388589929	chr7	55205312	55205394
AMPL30308	EGFR_AMPL388589929	chr7	55205331	55205420
AMPL30309	EGFR_AMPL388589929	chr7	55205412	55205493
AMPL30310	EGFR_AMPL388589929	chr7	55205437	55205526
AMPL30311	EGFR_AMPL388589929	chr7	55205515	55205590
AMPL30312	EGFR_AMPL388589929	chr7	55205575	55205653
AMPL656423	IDH2_AMPL1482307748	chr15	90088424	90088511
AMPL373004	IDH2_AMPL1482307748	chr15	90088509	90088609
AMPL370993	IDH2_AMPL1482307748	chr15	90088524	90088622
AMPL370994	IDH2_AMPL1482307748	chr15	90088619	90088702
AMPL370997	IDH2_AMPL1482307748	chr15	90088668	90088742

Tabla Suplementaria N°4. Comorbilidades y uso de medicamentos detallados, de pacientes con gliomas de alto grado incluidos en el estudio.

Código	Cirugía	Sexo	Edad	Comorbilidades									Medicamentos											
				Obesidad	HTA	Diabetes	Res. Insulina	TBQ	Índice Paquetes-Año	DLP	Hipotiroidismo	Otro cáncer	Anticonvulsivantes (≥1 semana)	Corticoides (≥1 semana)	Aspirina	TACO	IECA	ARAI	Atenolol	Metformina	Insulina	Atorvastatina	Paracetamol	Benzodiazepina
2018-01	24-01-18	1	73	0	1	0	0	1	20	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
2018-02	29-01-18	0	31	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2018-03	30-01-18	0	57	1	0	0	0	1	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2018-04	13-02-18	1	60	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
2018-05	16-02-18	1	72	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
2018-06	19-02-18	1	63	0	1	0	1	1	5	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0
2018-08	02-03-18	0	71	1	0	0	0	1	8	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2018-09	06-04-18	1	45	0	0	0	0	1	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2018-11	20-04-18	0	68	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	Tamoxifeno
2018-12	07-05-18	1	61	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2018-14	15-06-18	1	52	0	0	1	0	1	3	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2018-15	10-07-18	0	76	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	Levotiroxina
2018-16	30-07-18	1	53	0	1	0	0	1	2	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
2018-18	04-10-18	0	57	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	Levotiroxina
2018-19	08-10-18	0	57	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
2018-20	22-10-18	0	73	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0
2018-21	19-11-18	0	74	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1
2019-25	22-02-19	1	69	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
2019-26	08-03-19	0	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Código	Cirugía	Sexo	Edad	Comorbilidades									Medicamentos																	
				Obesidad	HTA	Diabetes	Res. Insulina	TBQ	Índice Paquetes-Año	DLP	Hipotiroidismo	Otro cáncer	Anticonvulsivantes (≥1 semana)	Corticoides (≥1 semana)	Aspirina	TACO	IECA	ARAI	Atenolol	Metformina	Insulina	Atorvastatina	Paracetamol	Benzodiazepina	Omeprazol	Otros				
2019-28	01-04-19	1	50	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2019-29	05-04-19	0	48	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2019-30	08-04-19	0	50	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2019-31	18-04-19	1	75	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
2019-32	01-05-19	0	69	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2019-33	03-05-19	1	34	0	0	0	0	1	?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2019-34	03-05-19	0	71	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2019-35	17-05-19	0	39	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	Levotiroxina, Sertralina
2019-36	27-06-19	1	62	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
2019-37	19-08-19	0	65	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2019-39	23-09-19	0	55	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0
2019-40	04-10-19	1	68	1	1	0	0	1	0,5	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Carvedilol, Nifedipino
2019-41	14-10-19	0	67	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Levotiroxina
2019-42	18-10-19	1	44	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2019-43	11-11-19	0	71	0	1	0	0	1	2	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
2019-44	18-11-19	1	65	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	Carvedilol	0
2019-45	23-12-19	0	52	0	0	0	0	1	10	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2020-46	07-01-20	1	58	1	1	0	0	1	4	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Levotiroxina
2020-47	16-01-20	0	58	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	Levotiroxina	0
2020-48	12-02-20	0	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla Suplementaria 5. *Presentación clínica y desenlaces clínicos de pacientes con gliomas de alto grado incluidos en el estudio.*

Código	Presentación Clínica								Desenlace					
	Tiempo de síntomas (semanas)	Cefalea	Vómitos	Crisis convulsivas	Compromiso de conciencia cualitativo	Déficit focales	KPS preop	ECOG preop	Sobrevida Global (meses)	Muerto	Sobrevida Libre de Enfermedad (meses)	Progresión	KPS postop	KPS 1m
2018-01	3,9	0	0	0	0	1	80	1	7,8	1	-	-	30	
2018-02	57,4	1	1	1	0	0	90	1	30,2	1	2,6	1	90	100
2018-03	19,6	1	0	1	0	1	80	1	43,2	0	43,2	0	90	100
2018-04	29,7	0	0	1	0	1	20	4	13,5	1	6,7	1	30	20
2018-05	4,0	0	0	0	0	1	80	1	7,8	1	4,8	1	80	80
2018-06	37,6	0	0	1	0	0	100	0	9,8	1	4,4	1	80	80
2018-08	13,0	0	0	0	0	1	80	1	16,6	1	13,2	1	90	90
2018-09	3,0	1	1	0	0	1	90	1	13,8	1	9,0	1	90	90
2018-11	72,1	1	0	0	0	0	90	1	40,6	0	13,0	1	90	90
2018-12	9,6	1	0	1	0	0	90	0	23,8	1	6,9	1	90	100
2018-14	4,4	0	0	1	0	0	100	0	13,8	1	4,5	1	100	100
2018-15	31,6	0	0	1	0	1	90	1	19,7	1	13,9	1	50	70
2018-16	17,1	1	0	1	0	1	90	1	33,8	1	25,6	1	70	80
2018-18	4,7	1	0	0	1	1	90	1	35,0	0	30,0	1	90	90
2018-19	14,1	1	0	1	1	1	70	2	34,9	0	9,7	1	70	70
2018-20	7,3	0	0	0	1	1	50	2	10,4	1	4,3	1	80	90
2018-21	37,6	1	0	1	1	1	70	2	5,1	1	2,0	1	70	60
2019-25	11,9	1	0	1	1	1	40	3	5,7	1	3,9	1	40	50
2019-26	5,0	1	0	0	1	1	60	2	29,8	0	29,8	0	60	60

Código	Presentación Clínica								Desenlace					
	Tiempo de síntomas (semanas)	Cefalea	Vómitos	Crisis convulsivas	Compromiso de conciencia cualitativo	Déficit focales	KPS preop	ECOG preop	Sobrevida Global (meses)	Muerto	Sobrevida Libre de Enfermedad (meses)	Progresión	KPS postop	KPS 1m
2019-28	3,9	0	0	1	1	1	90	1	5,7	1	0,0	1	90	60
2019-29	9,0	1	0	0	0	1	100	0	8,4	1	6,6	1	100	90
2019-30	6,7	1	0	0	0	1	80	1	15,2	1	10,5	1	90	100
2019-31	24,0	0	0	0	1	1	30	4	0,6	1	0,0	1	40	
2019-32	8,1	0	0	1	1	1	70	2	6,4	1	3,9	1	80	80
2019-33	13,0	1	1	1	1	1	50	3	14,5	1	11,4	1	80	90
2019-34	9,0	0	0	1	1	1	70	2	3,5	1	1,0	1	60	60
2019-35	58,7	1	1	0	0	0	90	1	27,5	0	27,5	0	100	100
2019-36	12,4	1	0	0	0	0	100	1	26,1	0	26,1	0	100	100
2019-37	5,0	1	1	1	1	0	90	0	6,4	1	3,5	1	90	90
2019-39	12,0	1	0	0	1	1	50	3	1,9	1	0,0	1	40	40
2019-40	Asintomático	0	0	0	0	0	100	0	6,0	1	1,5	1	90	60
2019-41	6,1	1	0	0	1	1	80	1	15,6	1	8,7	1	80	90
2019-42	4,0	1	0	0	0	0	90	1	3,0	1	0,0	1	60	60
2019-43	3,1	0	0	0	1	1	80	2	3,8	1	0,0	1	80	80
2019-44	17,3	0	0	0	1	1	70	2	5,6	1	3,3	1	70	70
2019-45	7,4	1	0	0	0	1	80	1	3,0	1	1,5	1	60	60
2020-46	8,0	1	0	0	0	0	80	2	19,7	0	19,6	0	90	90
2020-47	8,0	1	0	0	0	1	80	1	3,1	1	1,5	1	80	80
2020-48	4,0	1	1	1	1	1	50	3	32,8	1	24,3	1	50	60

Tabla Suplementaria 6. Razones de amplificación de EGFR en comparación a pacientes controles sanos, calculadas en base a análisis de secuenciación de amplicones, mediante el programa CNVpanelizer.

Muestra	Gen	EGFR ratio	EGFR límite inferior	EGFR límite superior	EGFR status
GBM-01	EGFR	1,41	0,82	2,22	Normal
GBM-02	EGFR	0,88	0,53	1,50	Normal
GBM-03	EGFR	9,76	5,66	16,84	Amplification
GBM-04	EGFR	3,94	2,51	6,18	Amplification
GBM-05	EGFR	1,15	0,68	1,99	Normal
GBM-06	EGFR	-	-	-	-
GBM-08	EGFR	0,75	0,46	1,19	Normal
GBM-09	EGFR	29,71	27,91	32,88	Amplification
GBM-11	EGFR	1,03	0,51	1,75	Normal
GBM-12	EGFR	11,01	6,39	17,52	Amplification
GBM-14	EGFR	5,87	6,61	6,76	Amplification
GBM-15	EGFR	0,82	0,53	1,27	Normal
GBM-16	EGFR	1,00	1,00	1,05	Normal
GBM-18	EGFR	2,54	0,83	6,24	Normal
GBM-19	EGFR	1,01	0,64	1,45	Normal
GBM-20	EGFR	0,84	0,51	1,37	Normal
GBM-21	EGFR	2,78	0,36	7,92	Normal
GBM-25	EGFR	5,60	1,31	22,96	Amplification
GBM-26	EGFR	-	-	-	-
GBM-28	EGFR	1,39	0,83	2,02	Normal
GBM-29	EGFR	1,07	0,61	1,65	Normal
GBM-30	EGFR	2,84	1,78	4,13	Amplification
GBM-31	EGFR	1,40	0,92	2,00	Normal
GBM-32	EGFR	1,00	0,67	1,44	Normal
GBM-33	EGFR	0,86	0,56	1,21	Normal
GBM-34	EGFR	1,07	0,68	1,57	Normal
GBM-35	EGFR	0,63	0,41	0,90	Normal
GBM-36	EGFR	-	-	-	-
GBM-37	EGFR	13,36	9,53	18,80	Amplification
GBM-39	EGFR	19,97	13,43	28,73	Amplification
GBM-40	EGFR	1,10	0,79	1,54	Normal
GBM-41	EGFR	8,00	5,49	11,99	Amplification
GBM-42	EGFR	-	-	-	-
GBM-43	EGFR	-	-	-	-
GBM-44	EGFR	1,38	1,02	1,92	Amplification
GBM-45	EGFR	0,99	0,74	1,32	Normal
GBM-46	EGFR	0,97	1,02	1,34	Normal
GBM-47	EGFR	4,37	1,88	8,26	Amplification
GBM-48	EGFR	0,82	0,69	0,81	Normal

ANEXO N°1: CONSENTIMIENTOS INFORMADOS

CONSENTIMIENTO INFORMADO - PACIENTE

“Papel de la respuesta al mal plegamiento de proteínas en distintos grupos moleculares de Glioblastoma Multiforme”



Nombre del Investigador Principal: Dr. Rodrigo Fernández G. /Dr. David Rojas Z.

Institución: Instituto de Neurocirugía y Departamento de Ciencias Neurológicas Oriente, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Teléfono: 22 575 4600.

Invitación a participar: Le estamos invitando a participar en un proyecto de investigación para caracterizar el papel del mal plegamiento de proteínas en el glioblastoma multiforme (GBM), según los distintos grupos moleculares de este tumor. El estudio se realizará en el Servicio de Neurocirugía Adultos del Instituto de neurocirugía Asenjo y se planea reclutar 60 pacientes con GBM y 5 pacientes controles.

Objetivos: Esta investigación tiene por objetivos establecer el papel de la respuesta al mal plegamiento de proteínas en distintos grupos moleculares definidos por las mutaciones de IDH1/2, del promotor de TERT y la amplificación del gen EGFR en pacientes con glioblastoma multiforme, y correlacionar estas alteraciones con el pronóstico de los pacientes.

Procedimientos: Si Ud. Presenta un tumor cerebral en el estudio por Resonancia Magnética, con sospecha de un glioma de alto grado, y acepta participar en este estudio:

- Se utilizará parte de la muestra obtenida para este estudio, además del estudio de la biopsia que se realiza en el servicio de anatomía patológica.
- Si el resultado de su biopsia es un glioblastoma multiforme, Ud. ingresará a un protocolo de seguimiento clínico e imagenológico, el que incluirá controles bimensuales (o más frecuente en caso necesario) con el Dr. Rodrigo Fernández, y un estudio imagenológico postoperatorio inmediato (primeras 48 horas) con Resonancia Magnética cerebral, y posteriormente cada 3-4 meses o más frecuente en caso necesario.
- Si el resultado de su biopsia es un glioblastoma multiforme, se utilizará parte de la biopsia procesada en el Servicio de Anatomía Patológica para el estudio de marcadores genéticos de GBM y de respuesta a mal plegamiento de proteínas. Además, se realizarán cultivos celulares del tejido obtenido para evaluar la respuesta al mal plegamiento de proteínas.

Parte de la muestra obtenida en su cirugía será almacenada en el Laboratorio de Investigación Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile para futuros estudios de marcadores moleculares relacionados con gliomas de alto grado.

Ninguno de estos procedimientos interferirá con el estudio ni el tratamiento habitual que recibiría si no acepta participar en el proyecto.

Costos: Las evaluaciones clínicas del protocolo de seguimiento de este estudio serán gratuitas para usted. El copago de las resonancias magnéticas del protocolo de seguimiento de este estudio serán gratuitas para usted. Como participante en este estudio Ud. o su sistema previsual deberán financiar las hospitalizaciones, exámenes y tratamientos habituales para el estudio y tratamiento de su enfermedad.

Beneficios: Este estudio permitirá determinar marcadores moleculares importantes para establecer el pronóstico de su enfermedad. Los resultados de los estudios genéticos no serán inmediatos, y serán comunicados a Ud. solo en caso necesario. El desarrollo de este estudio significará un beneficio para el progreso del conocimiento y para el eventual desarrollo de nuevas terapias para este tipo de tumores.

Alternativas: Si Ud. decide no participar en esta investigación no tendrá que dar explicaciones y ello no modificará la calidad de la atención médica brindada a Ud. por parte del Instituto de Neurocirugía Asenjo.

Compensación: Ud. no recibirá ninguna compensación económica por su participación en el estudio.

Confidencialidad: Toda la información derivada de su participación en este estudio será conservada en forma de estricta confidencialidad, lo que incluye el acceso de los investigadores o agencias supervisoras de la investigación. Cualquier publicación o comunicación científica de los resultados de la investigación será completamente anónima.

Información adicional: Ud. o su médico tratante serán informados si durante el desarrollo de este estudio surgen nuevos conocimientos o complicaciones que puedan afectar su voluntad de continuar participando en la investigación.

Voluntariedad: Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria y se puede retirar en cualquier momento comunicándolo al investigador o a su médico tratante, sin que ello signifique modificaciones en el estudio y tratamiento habituales de su enfermedad. De igual manera su médico tratante o el investigador podrán determinar su retiro del estudio si consideran que esa decisión va en su beneficio.

Complicaciones: Las posibles complicaciones derivadas de los estudios con RM cerebral serán minimizadas mediante la realización de exámenes sin medio de contraste en caso de que Ud. presente una alteración de la función renal, existiendo una tasa muy baja de complicaciones asociadas a este procedimiento. La obtención de la muestra intraoperatoria de tumor para los fines de este estudio no generará un mayor riesgo operatorio en comparación con el procedimiento habitual de resección tumoral o biopsia.

Derechos del participante: Si Ud. requiere cualquier otra información sobre su participación en este estudio puede llamar a:

Investigadores:

- Dr. Rodrigo Fernández G (Fono: +56998459957)

Conclusión:

Después de haber recibido y comprendido la información de este documento y de haber podido aclarar todas mis dudas, otorgo mi consentimiento para participar en el proyecto “*Papel de la respuesta al mal plegamiento de proteínas en distintos grupos moleculares de Glioblastoma Multiforme*”

_____ Nombre del Paciente	_____ Firma	_____ Fecha
_____ Nombre de informante	_____ Firma	_____ Fecha
_____ Investigador Responsable	_____ Firma	Fecha _____
_____ Director del Hospital	_____ Firma	_____ Fecha

**Si se trata de un paciente incompetente, registrar nombre del paciente y de su apoderado.*

CONSENTIMIENTO INFORMADO – PACIENTE CONTROL

“Papel de la respuesta al mal plegamiento de proteínas en distintos grupos moleculares de Glioblastoma Multiforme”

Nombre del Investigador Principal: Dr. Rodrigo Fernández G. /Dr. David Rojas Z.

Institución: Instituto de Neurocirugía y Departamento de Ciencias Neurológicas Oriente, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Teléfono: 22 575 4600.

Invitación a participar: Le estamos invitando a participar en un proyecto de investigación para caracterizar el papel del mal plegamiento de proteínas en el glioblastoma multiforme (GBM), según los distintos grupos moleculares de este tumor. El estudio se realizará en el Servicio de Neurocirugía Adultos del Instituto de neurocirugía Asenjo y se planea reclutar 60 pacientes con GBM y 5 pacientes controles. Para realizar este estudio es necesario contar con muestras de tejido normal para comparar los niveles de activación de la respuesta al mal plegamiento de proteínas.

Objetivos: Esta investigación tiene por objetivos establecer el papel de la respuesta al mal plegamiento de proteínas en distintos grupos moleculares definidos por las mutaciones de IDH1/2, del promotor de TERT y la amplificación del gen EGFR en pacientes con glioblastoma multiforme, y correlacionar estas alteraciones con el pronóstico de los pacientes.

Procedimientos: Si Ud. es sometido a una lobectomía temporal con amígdalo-hipocampectomía y acepta participar en este estudio:

- Se utilizará parte de la muestra obtenida para este estudio, además del estudio de la biopsia que se realiza en el servicio de anatomía patológica.
- Se utilizará parte de la biopsia procesada en el Servicio de Anatomía Patológica para el estudio de marcadores genéticos de GBM y de respuesta a mal plegamiento de proteínas. Además, se realizarán cultivos celulares del tejido obtenido para evaluar la respuesta al mal plegamiento de proteínas.

Parte de la muestra obtenida en su cirugía será almacenada en el Laboratorio de Investigación Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile para futuros estudios de marcadores moleculares relacionados con tumores cerebrales.

Ninguno de estos procedimientos interferirá con el estudio ni el tratamiento habitual que recibiría si no acepta participar en el proyecto.

Costos: Como participante en este estudio Ud. o su sistema previsional deberán financiar las hospitalizaciones, exámenes y tratamientos habituales para el estudio y tratamiento de su enfermedad. No existirán costos adicionales.

Beneficios: Este estudio permitirá determinar marcadores moleculares importantes para establecer el pronóstico de pacientes con gliomas de alto grado. Los resultados de los estudios moleculares realizados en el tejido obtenido en su cirugía serán comunicados a Ud. solo en caso necesario. El desarrollo de este estudio significará un beneficio para el progreso del conocimiento y para el eventual desarrollo de nuevas terapias para este tipo de tumores.

Alternativas: Si Ud. decide no participar en esta investigación no tendrá que dar explicaciones y ello no modificará la calidad de la atención médica brindada a Ud. por parte del Instituto de Neurocirugía Asenjo.

Compensación: Ud. no recibirá ninguna compensación económica por su participación en el estudio.

Confidencialidad: Toda la información derivada de su participación en este estudio será conservada en forma de estricta confidencialidad, lo que incluye el acceso de los investigadores o agencias supervisoras de la investigación. Cualquier publicación o comunicación científica de los resultados de la investigación será completamente anónima.

Información adicional: Ud. o su médico tratante serán informados si durante el desarrollo de este estudio surgen nuevos conocimientos o complicaciones que puedan afectar su voluntad de continuar participando en la investigación.

Voluntariedad: Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria y se puede retirar en cualquier momento comunicándolo al investigador o a su médico tratante, sin que ello signifique modificaciones en el estudio y tratamiento habituales de su enfermedad. De igual manera su médico tratante o el investigador podrán determinar su retiro del estudio si consideran que esa decisión va en su beneficio.

Complicaciones: La obtención de la muestra intraoperatoria para los fines de este estudio no generará un mayor riesgo operatorio en comparación con el procedimiento habitual de cirugía resectiva. **No se obtendrá tejido adicional al que se obtendría en caso de que Ud. decida no participar en este estudio**

Derechos del participante: Si Ud. requiere cualquier otra información sobre su participación en este estudio puede llamar a:

Investigadores:

- Dr. Rodrigo Fernández G (Fono: +56998459957)

Conclusión:

Después de haber recibido y comprendido la información de este documento y de haber podido aclarar todas mis dudas, otorgo mi consentimiento para participar en el proyecto *“Papel de la respuesta al mal plegamiento de proteínas en distintos grupos moleculares de Glioblastoma Multiforme”*

Nombre del Paciente

Firma

Fecha

Nombre de informante

Firma

Fecha

Investigador Responsable

Firma

Fecha

Director del Hospital

Firma

Fecha

**Si se trata de un paciente incompetente, registrar nombre del paciente y de su apoderado.*

ANEXO N°2: ACTA DE APROBACIÓN COMITÉ DE ÉTICA CIENTÍFICA DEL SERVICIO DE SALUD METROPOLITANO ORIENTE.



Servicio de Salud Metropolitano Oriente
Comité de Ética Científico

PROTOCOLO DE APROBACIÓN DE PROYECTOS CLÍNICOS

Con fecha 10 de Octubre de 2017, el CEC del S.S.M. Oriente analizó y aprobó el Proyecto de Tesis del Programa de Doctorado en Ciencias Médicas con especialidad en Neurocirugía Escuela de Postgrado – Facultad de Medicina Universidad de Chile, titulado:

“Papel pronóstico de la respuesta al mal plegamiento de proteínas en distintos grupos moleculares de glioblastomas multiforme”

y que conducirá como Investigador Principal el **Dr. Rodrigo Fernández** en el **Instituto de Neurocirugía Dr. Asenjo**, ubicado en José Manuel Infante 553, Santiago, Providencia, Región Metropolitana.

Se analizó y aprobó los siguientes documentos del Proyecto:

- Proyecto de Tesis Programa de Doctorado en Ciencias Médicas “Papel pronóstico de la respuesta al mal plegamiento de proteínas en distintos grupos moleculares de glioblastomas multiforme”.

Tomó conocimiento de:

- Autorización de la Dra. María Teresa Labra, Subdirector Médico del Instituto de Neurocirugía Dr. Asenjo, de fecha 07 de Septiembre de 2017.
- Solicitud de revisión de fecha 03 de Octubre de 2017.
- Directores de la Tesis:
Dr. Claudio Hetz Director de tesis Profesor Titular. Laboratorio de Estrés Celular y Biomedicina, Instituto de Neurociencia Biomédica, Facultad de Medicina – Universidad de Chile.
Dr. David Rojas Co-director de tesis Profesor Asistente de Neurocirugía. Departamento de Ciencias Neurológicas Oriente, Facultad de Medicina – Universidad de Chile.
Dr. José Manuel Matamala, Profesor Asistente de Neurología. Departamento de Ciencias Neurológicas Oriente, Facultad de Medicina – Universidad de Chile

Envío a usted la nómina de los miembros permanentes del CEC del S.S.M. Oriente al 10 de Octubre de 2017:

Dra. Sara Chernilo S.	Broncopulmonar (Presidente)	Inst. Nacional del Tórax
Dra. M. Esther Meroni L.	Geriatra (Secretaria)	Inst. Nac. de Geriatria
Dr. Ricardo Vacarezza	Asesor en Bioética	No institucional
EU Elena Núñez M.	Coordinadora	No institucional
Dr. Carlos Rey C.	Cardiólogo	Hospital del Salvador
Dr. Rómulo Melo Monsalve	Neurocirujano	Inst. Nac. de Neurocirugía
Dr. Manuel Sedano Lorca	Gineco-Obstetra	Hospital Dr. Luis Tisné
Dr. Lientur Taha M.	Neurocirujano	Inst. Nac. de Neurocirugía
Dr. Jorge Plasser Troncoso	Cirujano- Oncólogo	Hospital del Salvador
Sra. Angélica Sotomayor	Abogado	No institucional
Sr. Hugo Gutiérrez Guerra	Miembro de la Comunidad	No institucional

Dra. María Esther Meroni Layes
Secretaria



Santiago, 10 de Octubre de 2017

ANEXO N°3: ACTA DE APROBACIÓN COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE CHILE



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES



ACTA DE APROBACIÓN DE PROYECTO

FECHA: 23 de Enero de 2018.

PROYECTO: "PAPEL PRONÓSTICO DE LA RESPUESTA AL MAL PLEGAMIENTO DE PROTEÍNAS EN DISTINTOS GRUPOS MOLECULARES DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME".

INVESTIGADOR RESPONSABLE: DR. RODRIGO FERNÁNDEZ GAJARDO

INSTITUCIÓN: DEPARTAMENTO CIENCIAS NEUROLÓGICAS ORIENTE, FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE CHILE. PROYECTO DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS Y ESPECIALIDAD NEUROCIRUGÍA, TUTOR DR. CLAUDIO HETZ.

Con fecha 23 de Enero de 2018, el proyecto ha sido analizado a la luz de los postulados de la Declaración de Helsinki, de la Guía Internacional de Ética para la Investigación Biomédica que involucra sujetos humanos CIOMS 2016, y de las Guías de Buena Práctica Clínica de ICH 1996.

Sobre la base de la información proporcionada en el texto del proyecto el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, estima que el estudio propuesto está bien justificado y que no significa para los sujetos involucrados riesgos físicos, psíquicos o sociales mayores que mínimos.

En virtud de las consideraciones anteriores el Comité otorga la aprobación ética para la realización del estudio propuesto, dentro de las especificaciones del protocolo.

Este comité también analizó y aprobó el correspondiente documento de Consentimiento Informado en su versión modificada de fecha 17 de Enero de 2018. Además se toma conocimiento de carta de Director del Establecimiento o custodio de la base de datos o carta de compromiso del Investigador responsable de fecha 13 de Diciembre de 2017.

Se extiende este documento por el periodo de un año a contar desde la fecha de aprobación prorrogable según informe de avance y seguimiento bioético.

LUGAR DE REALIZACIÓN DEL ESTUDIO

- DEPARTAMENTO CIENCIAS NEUROLÓGICAS ORIENTE, INSTITUTO DE NEUROCIRUGÍA ASENJO.

Teléfono: 29789536 - Email: comiteceish@med.uchile.cl



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES



23 ENE. 2018

INTEGRANTES DEL COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS

NOMBRE	CARGO	RELACIÓN CON LA INSTITUCIÓN
Dr. Manuel Oyarzún G.	Presidente	Sí
Dr. Hugo Amigo C.	Miembro	Sí
Dra. Lucía Cifuentes O.	Miembro	Sí
Dra. Grisel Orellana V.	Miembro	Sí
Sra. Gina Raineri B.	Miembro	Sí
Dra. María Ángela Delucchi B.	Miembro	Sí
Dr. Miguel O'Ryan G.	Miembro	Sí
Sra. Claudia Marshall F.	Miembro	Sí
Dra. Julieta Gonzalez B.	Miembro	Sí
Prof. ^a Maria Luz Bascuñán R.	Miembro	Sí

Santiago, 23 de Enero de 2018.

Sra. Gina Raineri B.
Secretaria Ejecutiva CEISH

c.c.: - Proyecto N° 182-2017
- Archivo Acta n° 129

Teléfono: 29789536 - Email: comiteceish@med.uchile.cl

ANEXO N°4A: INGRESO A ESTUDIO



INGRESO A ESTUDIO

Nombre completo: _____

Edad: _____ Fecha de Ingreso: _____

Numero de ficha: _____

RUT: _____

Dirección: _____

Teléfonos de contacto: _____

Fecha de cirugía: _____

Comorbilidades:

DM2 () HTA () Dislipidemia () Tabaquismo () Índice Paquetes-Año: _____

Otras (especificar): _____

Medicamentos : _____

Fecha Inicio Sintomatología: _____

Fecha Primera Neuroimagen (TC o RM): _____

Fecha Primera Resonancia Magnética Cerebral: _____

Cirugías Previas: _____

Historia de Ingreso:

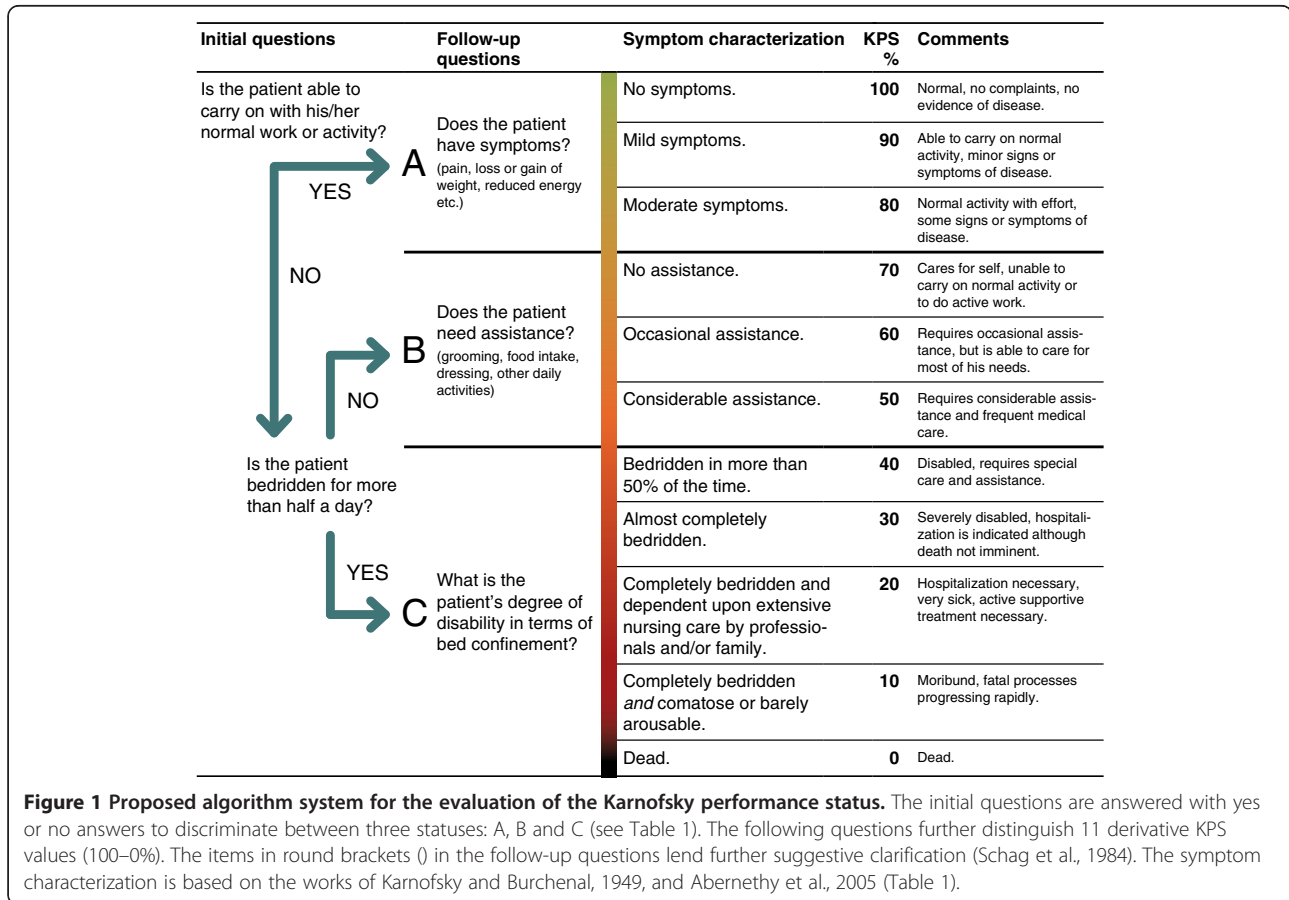
Signos vitales: PA _____; FC _____; T° _____; SatO2 _____.

Examen neurológico:

KPS ingreso: _____

KPS postoperatorio: _____

Puntuación	Situación Clínica - Funcional
100	Normal, asintomático. Sin evidencias de Enfermedad
90	Capaz de realizar actividades normales. Mínimos síntomas o signos de enfermedad
80	Capaz de realizar actividades normales con esfuerzo. Síntomas moderados de enfermedad
70	Capaz de cuidar de sí mismo. Incapaz de realizar actividades normales o trabajo
60	Requiere asistencia ocasional. Es capaz de cubrir la mayoría de sus necesidades
50	Requiere asistencia considerable, y cuidado profesional frecuente
40	Discapacitado, más de 50% tiempo en cama
30	Severamente discapacitado, prácticamente 100% tiempo en cama
20	Requiere admisión hospitalaria para manejo de soporte activo
10	Moribundo
0	Fallecido



ANEXO N°4B: CONTROL CLÍNICO



CONTROL CLÍNICO PROTOCOLO GBM-UPR

Nombre completo: _____
RUT: _____
Numero de ficha: _____
Hospital de Origen: _____
Fecha de Control: _____
Fecha de Quimioterapia: _____ Fármaco QT: _____ Dosis: _____
Fecha de Radioterapia: _____ Tipo de RT: _____ Dosis: _____
Oncólogo tratante: _____
Radioterapeuta Tratante: _____

ANAMNESIS:

Cefalea: Si - No. (EVA: _____)
Crisis convulsivas: Si - No. (Tipo de crisis y frecuencia: _____)
Náuseas y vómitos: Si - No.
Otra sintomatología: _____

KPS: _____

Anticonvulsivantes: Si - No. Fármaco y dosis Actual: _____
Modificaciones: _____

Corticoterapia: Si - No. Fármaco y dosis Actual: _____
Modificaciones: _____

Trombosis Venosa Profunda: Si - No. Tromboprofilaxis: Si - No

Examen físico general y neurológico: _____

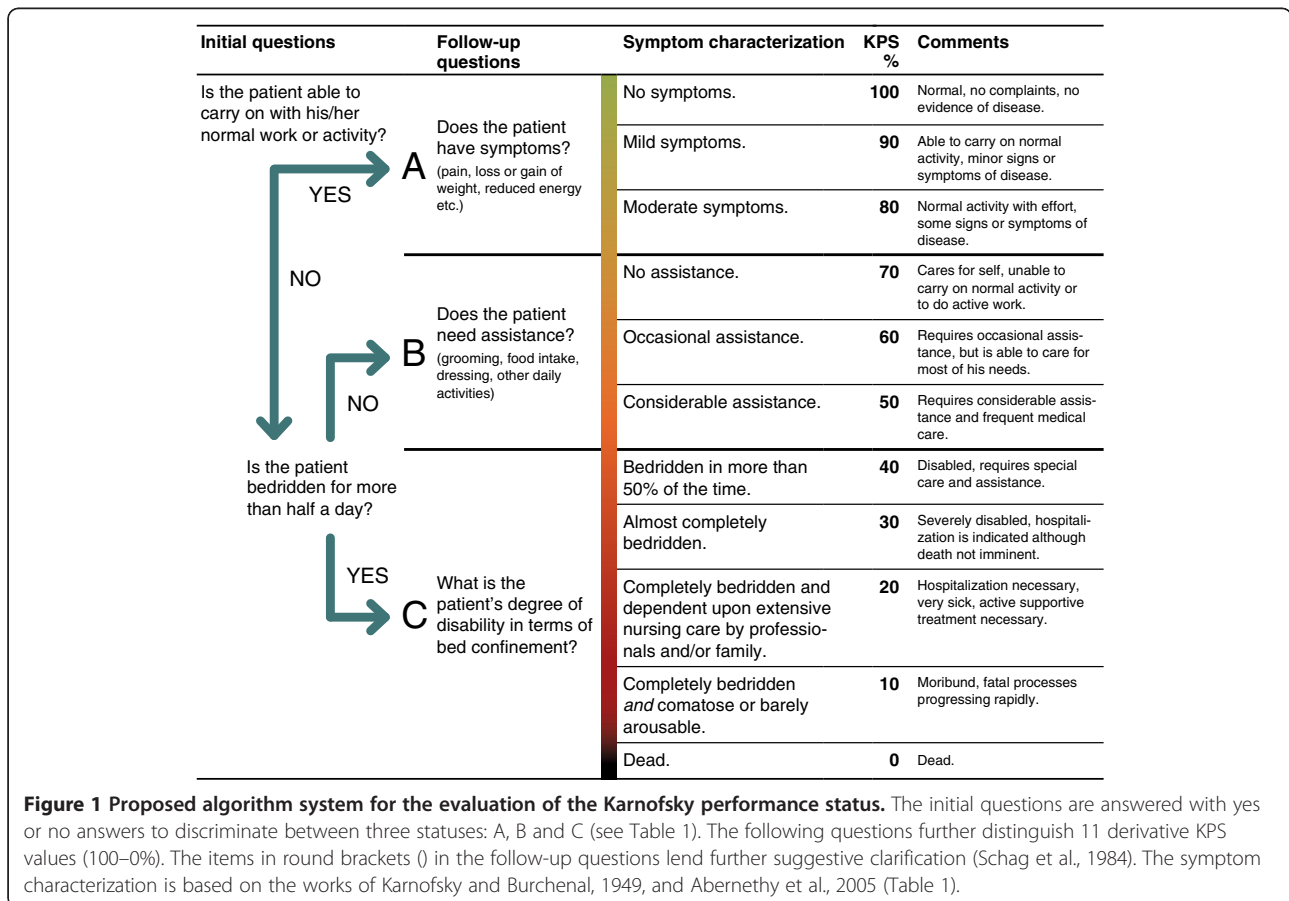
MMSE: _____

Exámenes de Laboratorio: _____

Nombre y Firma Médico Evaluador

KPS: _____

Puntuación	Situación Clínica - Funcional
100	Normal, asintomático. Sin evidencias de Enfermedad
90	Capaz de realizar actividades normales. Mínimos síntomas o signos de enfermedad
80	Capaz de realizar actividades normales con esfuerzo. Síntomas moderados de enfermedad
70	Capaz de cuidar de sí mismo. Incapaz de realizar actividades normales o trabajo
60	Requiere asistencia ocasional. Es capaz de cubrir la mayoría de sus necesidades
50	Requiere asistencia considerable, y cuidado profesional frecuente
40	Discapacitado, más de 50% tiempo en cama
30	Severamente discapacitado, prácticamente 100% tiempo en cama
20	Requiere admisión hospitalaria para manejo de soporte activo
10	Moribundo
0	Fallecido



ANEXO N°5: CRITERIOS DE PROGRESIÓN DE ENFERMEDAD

criterio	Respuesta Completa	Respuesta Parcial	Enfermedad Estable	Progresión
Realce T1 post administración de Gadolinio	No	$\geq 50\%$ □	$< 50\%$ □□pero $< 25\%$ □	$\geq 25\%$ □
T2/FLAIR	Estable o □	Estable o □	Estable o □	□
Nuevas lesiones	No	No	No	Si
Uso de corticoides	No	Estable o □	Estable o □	- ^a
Estado clínico	Estable o □	Estable o □	Estable o □	□
Requeridos para definir estado	Todos	Todos	Todos	Cualquiera

^a = Este criterio por sí solo no es suficiente para definir progresión tumoral