

Diferencias en la expresión de PEX entre el centro y la periferia tumoral de los gliomas. Relación con el subtipo histológico y el grado tumoral

M. Brell¹, J. Ibáñez¹, A. Felpete², B. Burguera², M. Frontera², M. E. Couce³

1- Servicio de Neurocirugía. Hospital Son Dureta. Palma de Mallorca

2- Unidad de Investigación. Hospital Son Dureta. Palma de Mallorca

3- Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Son Dureta. Palma de Mallorca

Resumen

Los gliomas de alto grado se caracterizan por su rápido crecimiento y su alta capacidad infiltrativa. En el proceso de invasión, las células neoplásicas interactúan con la matriz extracelular y con las células sanas del parénquima cerebral circundante. Las metaloproteinasas son endopeptidasas capaces de degradar la matriz extracelular favoreciendo la migración de las células tumorales. PEX, un fragmento derivado de la metaloproteinasas de matriz 2 (MMP-2), y expresado por numerosos tipos de tumores, se comporta como inhibidor de la proliferación y migración celular, así como de la angiogénesis tumoral. En el presente trabajo demostramos mediante el análisis topográfico de una serie de gliomas, que existen diferencias en la expresión de PEX entre áreas del centro y de la periferia tumoral a pesar de ser similares histológicamente. Ello supone una prueba más de la heterogeneidad de los gliomas, lo que debe tenerse en cuenta en el momento de planificar una biopsia diagnóstica o diseñar una estrategia terapéutica.

Palabras clave: Glioma, heterogeneidad, PEX, Metaloproteinasas, RT-PCR.

Abstract

Gliomas, particularly those of high WHO grade, share basic features of fast tumor growth and diffuse infiltration of brain tissue. Invasion of glioma cells requires interaction with the extracellular matrix and surrounding cells of the healthy brain tissue. Metalloproteinases degrade extracellular matrix molecules and create a more permissive environment for cell migration. A fragment of MMP-2 called PEX is naturally expressed in various human tumors and has been shown to inhibit angiogenesis, cell proliferation, and migration. Our study, by means of a topographical dissection of large resections of gliomas, demonstrates similar histological findings in central and peripheral regions of these tumors, no clear differences in tumor cell proliferation, but significant differences with regard to PEX RNA expression, particularly in the high grade group of gliomas. These results reinforce the notion of molecular heterogeneity within the glioma mass, which could be of importance when planning different therapeutic strategies in the future. In addition, they suggest the need for maintaining orientation in the sampling of these resection specimens and for the planning of a biopsy surgical procedure.

Keywords: Glioma, heterogeneity, PEX, Metalloproteinase, RT-PCR.

Introducción

Los gliomas son las neoplasias primarias más frecuentes del SNC. Una de sus principales características es su gran capacidad infiltrativa e invasiva del tejido cerebral en el que asientan. Es precisamente la invasión del parénquima cerebral por las células del glioma lo que determina en gran medida el comportamiento agresivo de estas neoplasias y es causa, en gran medida, del fracaso de la estrategia actual de tra-

tamiento (máxima resección segura seguida de radioterapia y quimioterapia)¹. Las bases genéticas del comportamiento biológico de los gliomas no son del todo conocidas en la actualidad, de modo que algunos autores han sugerido que la capacidad de infiltración difusa que muestran estas células sea probablemente debida a la activación de determinados genes². En ese sentido, en función de la expresión o no de un perfil genético específico de invasión, podrían distinguirse en el seno de un tumor dos

subpoblaciones celulares con comportamiento distinto: una población eminentemente proliferativa e inmóvil situada en el centro de la masa tumoral, y otra fundamentalmente invasiva, móvil y situada en la periferia del tumor³, donde tendrían lugar los fenómenos de angiogénesis, implicados e imprescindibles en los mecanismos de invasión tumoral^{4,5}. Las características biológicas de estas dos subpoblaciones han sido y continúan siendo en nuestros días motivo de investigación, ya que, un mejor entendimiento de las bases moleculares de esta heterogeneidad regional redundará en un mayor conocimiento de la patogénesis de los gliomas y de posibles dianas terapéuticas^{6,7}.

Las metaloproteinasas de matriz (MMP) son endopeptidasas fuertemente relacionadas con la invasión tumoral, ya que juegan un papel fundamental en la destrucción de la matriz extracelular y en la activación de numerosos factores de progresión⁸. La metaloproteinasa de matriz 2 (MMP-2) se ubica fundamentalmente en la superficie de los vasos sanguíneos y de las células tumorales, y es especialmente abundante en los gliomas de alto grado^{4,5,7}. Un fragmento derivado por autocatálisis de la misma y denominado PEX (noncatalytic C-terminal hemopexin-like domain) actúa simultáneamente como inhibidor de la angiogénesis, proliferación y migración celular, regulando la interacción de MMP-2 con la integrina α_3 , paso fundamental en el proceso de invasión⁹⁻¹¹. Estudios in vivo han demostrado la eficacia terapéutica de esta molécula en gliomas¹².

La expresión de PEX se ha relacionado con el grado histológico y el subtipo de glioma, y paradójicamente, parece ser máxima en el GBM y mínima en el oligodendroglioma, caracterizado por presentar menos capacidad invasiva y proliferativa y menor vascularización⁴.

En un estudio previo¹³, pudimos demostrar en una serie de gliomas, la existencia de diferencias en el metabolismo energético entre regiones distintas del mismo tumor. Además, estas diferencias no seguían una distribución aleatoria, sino que seguían un patrón característico en áreas concéntricas: la mayor capacidad antioxidante se situaba en el centro tumoral mientras que la máxima funcionalidad mitocondrial se situaba en la periferia. Del mismo modo, la angiogénesis, la proliferación y la migración celular parecen seguir también un patrón de distribución concéntrico. Por ello, y dado que PEX se comporta como inhibidor de la angiogénesis, proliferación y migración celular, el objetivo del presente estudio fue eva-

luar la expresión de PEX en el centro y en la periferia tumoral de una serie de gliomas, para analizar la posible heterogeneidad intra o inter-tumoral en la expresión del mismo. Además se estudió el impacto pronóstico de la expresión de PEX.

Material y Métodos

Selección de pacientes y muestras

Se incluyeron 28 pacientes con diagnóstico de tumor cerebral, atendidos en el Servicio de Neurocirugía del Hospital Universitario Son Dureta, y tributarios de cirugía exéctica. Todos los pacientes fueron intervenidos mediante craneotomía y resección en bloque de la lesión que fue enviada al laboratorio desde el quirófano en un periodo máximo de 10 minutos. Tras la evaluación histológica intraoperatoria para diagnóstico, se procedió a la disección concéntrica de las muestras (Figura 1), obteniéndose secciones representativas del centro y de la periferia tumoral para análisis en fresco. Se estudiaron un total de 56 regiones tumorales. La clasificación histológica de las mismas se efectuó de acuerdo a los criterios de la OMS¹⁴. La expresión de PEX se evaluó mediante RT-PCR en tiempo real (real time RT-PCR) En todos los casos se tomaron muestras inmediatamente adyacentes a las seleccionadas para análisis de PEX del centro y de la periferia, para tinción con hematoxilina-eosina y análisis histológico, así como para el análisis inmunohistoquímico de Ki-67 y p53. Se recogió toda la información clínica y de seguimiento de todos los pacientes, que fueron tratados de acuerdo a un protocolo preestablecido común. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de las Islas Baleares y por la Comisión de Investigación del Hospital Universitario Son Dureta. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado de participación en el estudio.

Análisis histológico e inmunohistoquímico

Se obtuvieron secciones de 5 μ m de los bloques de parafina del centro y la periferia tumoral para tinción con hematoxilina-eosina.

El análisis inmunohistoquímico se realizó con la ayuda del sistema automatizado Dual Link Envision+ detection de Dako con anticuerpos para la determinación de Ki-67 (Dako, clone MIB-1, dilución 1:800) y p53 (Dako, clone DO-7; dilución 1:200).

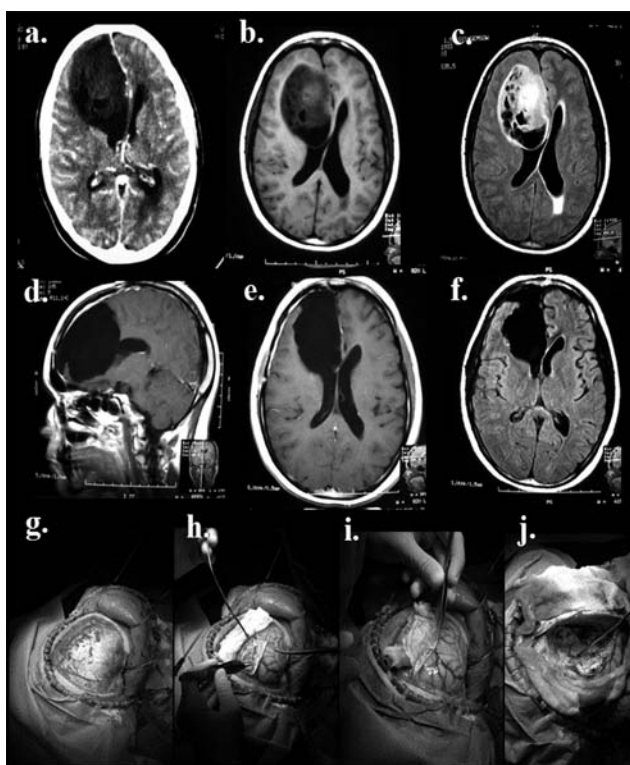


Figura 1. a. Imagen preoperatoria TC con contraste. Se observa voluminosa lesión intraxial frontal derecha, con áreas quísticas en su interior y captación sutil de contraste, que produce efecto de masa sobre estructuras de línea media.

b. Imagen preoperatoria RM axial T1. Se observa que la lesión posee cierta heterogeneidad con áreas espontáneamente hiperintensas en su interior.

c. Imagen preoperatoria RM axial flair.

Radiologicamente, la lesión posee límites bien definidos respecto al parénquima cerebral circundante.

d. Imagen postoperatoria RM sagital T1 con gadolinio, donde no se observan restos tumorales.

e. Imagen postoperatoria RM axial T1 con gadolinio que demuestra la exéresis completa y la normalización de estructuras de la línea media.

f. Imagen postoperatoria RM axial flair que demuestra la exéresis completa y la normalización de estructuras de la línea media.

g. Secuencia de imágenes intraoperatorias de la lesión expuesta en las imágenes 3.a., 3.b., 3.c., 3.d., 3.e. y 3.f.: craneotomía frontal derecha con exposición de la línea media.

h. Secuencia de imágenes intraoperatoria de la lesión expuesta en las imágenes 3.a., 3.b., 3.c., 3.d., 3.e. y 3.f.: apertura de la duramadre con base al seno longitudinal superior respetando las venas puente.

i. Secuencia de imágenes intraoperatoria de la lesión expuesta en las imágenes 3.a., 3.b., 3.c., 3.d., 3.e. y 3.f.: tras la apertura dural queda expuesto el lóbulo frontal, observándose las circunvoluciones ensanchadas y

aplanadas como signos indirectos de la presencia de la lesión subyacente, pero sin apreciarse, a diferencia de lo que cabría esperar por la imagen preoperatoria, un tumor de límites claramente definidos.

j. Secuencia de imágenes intraoperatoria de la lesión expuesta en las imágenes 3.a., 3.b., 3.c., 3.d., 3.e. y 3.f.: lecho de resección quirúrgica tras la extirpación. La hoz cerebral y el ventrículo lateral resultaron límites anatómicos claramente identificables en el plano medial y en profundidad. En el plano lateral, la diferencia de consistencia y color guió la resección. Obsérvese en la imagen el ventrículo lateral abierto y la superficie endimaria y plexo coroide del mismo expuestos.

El análisis inmunohistoquímico se realizó de manera semicuantitativa, determinándose un índice de proliferación Ki-67 para cada muestra, mientras que para p53 se consideró la inmunexpresión débil/focal (1+) cuando una minoría de las células mostraban expresión de la proteína siendo esta además débil o cuando sólo algunas células dispersas mostraban reactividad, moderada (2+) cuando menos del 50% de las células expresaban la proteína y fuerte/difusa (3+) cuando se observaban más del 50% de las células positivas.

RT PCR en tiempo real

La extracción de ARN del tejido se efectuó con el kit comercial RNeasy Lipid tissue Mini kit (Qiagen), y con la ayuda de la estación de trabajo QiaCube (Qiagen), mientras que para la retrotranscripción se empleó el kit comercial Superscript III kit (Invitrogen), siguiendo las especificaciones del fabricante. La PCR en tiempo real se realizó con el sistema 7500 ABI system (Applied Biosystems), de acuerdo a protocolos estándar y con reactivos SybrGreen (Applied Biosystems).

Las reacciones de PCR se efectuaron para un volumen total 12µl que contenía 2µl de ADNc a una dilución de 1:10. Todas las reacciones se realizaron por triplicado. Los niveles de expresión se calcularon por el método de la curva estándar¹⁵.

La normalización de la expresión génica en todas las muestras se efectuó con 3 genes control (house-keeping genes) (ABL1, TBP y HPRT1)^{16, 17}. Las secuencias de los cebadores se detallan en la Tabla I.

Gen	Secuencias de los cebadores	Tamaño del producto de la PCR (bp)	T _m (°C)
ABL	S 5'-CAACTGCTTCTGATGGCAA-3'	92	57
	A 5'-CGGCCACCGTTGAATGAT-3'		
TBP	S 5'-GAGCTGTGATGTGAAGTTTCC-3'	117	57
	A 5'-TCTGGGTTTGATCATCTGTAG-3'		
HPRT1	S 5'-TGAGGATTGGAAAGGGTGT-3'	118	56
	A 5'-GAGCACACAGAGGGCTACAA-3'		
PEX	S 5'-TTGACGGTAAGGACGGACTC-3'	153	59
	A 5'-ACTTGCAGTACTCCCCATCG-3'		

Tabla 1.

Análisis estadístico

Debido que la muestra no se ajusta a una distribución normal, se emplearon test estadísticos no paramétricos en el análisis. Las diferencias intratumorales en la expresión de PEX se analizaron mediante el test de Wilcoxon para datos apareados, mientras que las diferencias intertumoraes fueron evaluadas mediante el test de la U de Mann-Whitney. Sólo se consideró como significativo el nivel de significación $P < 0.05$.

La supervivencia global fue calculada desde el día del tratamiento quirúrgico hasta la fecha del éxitus o de la última visita y la supervivencia libre de progresión desde el día de la intervención hasta la fecha de recidiva o progresión tumoral. El análisis de supervivencia se efectuó mediante el cálculo de la curva de supervivencia de acuerdo con el método de Kaplan-Meier y la probabilidad de supervivencia entre subgrupos fue comparada mediante el test de log-rank. Todo el análisis estadístico se efectuó con el paquete estadístico SPSS 16.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL)

Resultados

Las principales características clínicas y patológicas de la serie se muestran en la Tabla II. Se incluyeron un total de 28 pacientes, 24 con diagnóstico de glioma y 4 afectos de metástasis cerebrales. Diecisiete casos (68%) fueron gliomas de alto grado, 12 (43%) GBM y 7 (25%) gliomas anaplásicos, mientras que 4 tumores (14%) fueron gliomas de bajo grado. Siete gliomas presentaban componente oligodendroglioma (4 oligodendrogliomas de bajo grado y 3 oligodendrogliomas anaplásicos). Veinte pacientes (71.4%) fueron varones, y, la mediana de edad para

toda la serie fue de 53 años (rango, 14-81). Todos los pacientes fueron sometidos a cirugía exéretica lográndose una resección completa en 15 pacientes (53.5%) y una resección parcial en 13 casos (46.5%). Tras una mediana de seguimiento de 14 meses (rango, 1.1-29.1), 15 pacientes (53.5%) permanecían vivos, 10 pacientes (35.7%) habían fallecido y 3 casos se habían perdido de seguimiento. La mediana de supervivencia para los pacientes afectos de GBM fue de 8.8 meses (rango, 4.6-12.9), y para pacientes diagnosticados de metástasis de 4.4 meses (rango, 3.3-4.6), mientras que la supervivencia mediana para los pacientes con glioma anaplásico o glioma de bajo grado no se había alcanzado a fin de seguimiento.

Análisis histológico e inmunohistoquímico

Se observó una alta densidad celular tanto en el centro como en la periferia de los tumores analizados. En la región central de 9 tumores se detectó necrosis con núcleos en empalizada, y en 6 de estos se observó la presencia de infarto y trombosis vascular. En 8 de estos tumores con necrosis central también se observó necrosis en la periferia, y en 3 de ellos áreas de infarto tumoral. Se identificó vascularización glomeruloide y/o proliferación endotelial en 13 regiones centrales y en 8 periféricas. No se observaron diferencias significativas en la densidad celular o en la presencia de necrosis entre el centro y la periferia de las lesiones. La proliferación vascular en forma de vascularización glomeruloide y/o proliferación endotelial se identificó con mayor frecuencia en las áreas centrales de los tumores que en las periféricas. El índice de proliferación celular Ki-67 fue similar en el centro y la periferia de las lesiones, oscilando entre el 5 y el 100%. Todos estos resultados se muestran en la Tabla III.

RT-PCR en tiempo real.

Los resultados de la RT-PCR en tiempo real confirman la existencia de expresión de PEX en una serie de gliomas de diferente grado y subtipo histológico, así como en 4 metástasis cerebrales. Se hallaron diferencias en la expresión de PEX entre el centro y la periferia lesional en todos los casos, siendo mayor la expresión de PEX en el centro con respecto a la periferia en la mayoría de los tumores analizados (68%) (Tabla IV). Estas diferencias alcanzaron significación estadística en los gliomas ($p=0.031$) y especialmente en los gliomas de alto grado ($p=0.022$) (Figura 2)

Caso nº	Edad / Género	Histología	Tipo de cirugía	Radioterapia	Quimioterapia
1	60 / v	OA	RC	Si	Si
2	41 / v	GBG	RC	No	No
3	42 / v	AA	RP	Si	Si
4	47 / v	GBM	RP	Si	Si
5	65 / f	MET	RC	No	No
6	79 / f	GBM	PR	No	No
7	79 / v	MET	RC	Si	Si
8	20 / v	AA	RP	Si	Si
9	69 / v	GBM	RP	Si	Si
10	46 / v	GBG	RC	No	No
11	36 / v	GBG	RC	No	No
12	44 / v	GBM	RC	Si	Si
13	73 / v	GBM	RP	Si	No
14	24 / f	OA	RC	Si	Si
15	81 / v	GBM	RC	No	No
16	79 / f	GBM	RP	Si	No
17	60 / v	GBM	RP	Si	Si
18	41 / v	OA	RC	Si	Si
19	79 / f	GBM	RP	Si	Si
20	15 / v	AA	RC	Si	Si
21	45 / v	GBG	RP	No	No
22	53 / v	MET	RC	Si	No
23	14 / v	AA	RP	Si	Si
24	68 / f	GBM	RP	Si	Si
25	61 / v	MET	RC	Si	No
26	65 / f	GBM	RC	Si	Si
27	52 / f	GBM	RC	Si	Si
28	53 / v	GBG	RP	No	No

Tabla 2: Características clinicopatológicas

OA: Oligodendroglioma Anaplásico; GBG: Glioma de bajo grado; AA: Astrocitoma Anaplásico; Met: Metástasis;
GBM: Glioblastoma; OA: Oligodendroglioma Anaplásico; RC: Resección completa; RP: Resección parcial

Casos	Densidad celular	Necrosis en empalizada	Necrosis de infarto	Proliferación vascular	P53	Ki-67 %
1 centro	Alta	Si	No	Si	++	60
1 perifería	Alta	Si	No	No	++	70
2 centro	Baja	No	No	No	++	<5
2 perifería	Media	No	No	No	++	<5
3 centro	Media	No	No	No	+++	8
3 perifería	Baja	No	No	No	+++	25
4 centro	Alta	Si	Si	No	++	<5
4 perifería	Alta	Si	Si	No	++	<5
5 centro	--	--	--	--	--	--
5 perifería	--	--	--	--	--	--
6 centro	Alta	No	Si	Si	++	80
6 perifería	Media	No	Si	Si	++	90
7 centro	--	--	--	--	--	--
7 perifería	--	--	--	--	--	--
8 centro	Baja	No	No	No	++	<5
8 perifería	Baja	No	No	No	++	<5
9 centro	Alta	Si	Si	Si	+	35
9 perifería	Media	No	No	Si	0	<5
10 centro	Media	No	No	No	+	10
10 perifería	Alta	No	No	No	+	20
11 centro	Media	No	No	No	0	10
11 perifería	Baja	No	No	No	+	<5
12 centro	Alta	No	No	Si	++	80
12 perifería	Media	No	No	No	++	30
13 centro	Alta	Si	Si	Si	0	70

Tabla 3: Datos histológicos e inmunohistoquímicos

Casos	Densidad celular	Necrosis en empalizada	Necrosis de infarto	Proliferación vascular	P53	Ki-67 %
13 perifería	Alta	Si	Si	Si	++	75
14 centro	Media	No	No	No	++	10
14 perifería	Baja	No	No	No	++	15
15 centro	Alta	Si	Si	Si	++	20
15 perifería	Alta	Si	Si	Si	++	20
16 centro	Alta	Si	No	Si	--	--
16 perifería	Alta	Si	No	Si	--	--
17 centro	Alta	No	Si	Si	++	50
17 perifería	Alta	No	Si	Si	++	45
18 centro	Media	No	No	No	++	15
18 perifería	Media	No	No	No	++	20
19 centro	Alta	Si	Si	Si	+	45
19 perifería	Alta	Si	No	Si	+	35
20 centro	Alta	No	No	No	+++	50
20 perifería	Alta	No	No	No	+++	25
21 centro	Baja	No	No	No	0	<5
21 perifería	Baja	No	No	No	0	<3
22 centro	--	--	--	--	--	--
22 perifería	--	--	--	--	--	--
23 centro	Alta	No	No	Si	0	>50
23 perifería	Baja	No	No	No	0	>50
24 centro	Media	Si	Si	Si	+	45
24 perifería	Media	Si	No	Si	++	40
25 centro	--	--	--	--	--	--
25 perifería	--	--	--	--	--	--

Tabla 3: Datos histológicos e inmunohistoquímicos

Casos	Densidad celular	Necrosis en empalizada	Necrosis de infarto	Proliferación vascular	P53	Ki-67 %
26 centro	Alta	No	Si	Si	+++	45
26 perifería	Media	No	Si	Si	++	>50
27 centro	Alta	Si	No	Si	++	50
27 perifería	Alta	Si	No	Si	+	30
28 centro	Baja	No	No	No	++	<3
28 perifería	Baja	No	No	No	+++	<3

-- = No aplicable;

Tabla 3: Datos histológicos e inmunohistoquímicos

En lo que respecta a la heterogeneidad inter-tumoral, la expresión de PEX fue significativamente mayor en el centro de los gliomas de alto grado que en el centro de las metástasis (p=0.039), mientras que sólo se observó una tendencia hacia la significación estadística al comparar la expresión de PEX en el centro de los gliomas de alto grado vs en los gliomas de bajo grado (p=0.06) (Figura 3). No se hallaron diferencias estadísticamente significativas cuando se comparó la expresión de PEX en la periferia de los distintos subtipos tumorales.

La expresión de PEX no mostró valor pronóstico de supervivencia global o supervivencia libre de progresión en los pacientes con GBM. Dicho de otro modo, no se halló una mayor expresión de PEX en el centro ni en la periferia de los tumores pertenecientes a pacientes con larga supervivencia.

Discusión

El crecimiento de los gliomas depende del balance entre factores estimulantes e inhibidores de la angiogénesis, invasión y proliferación celular. Algunos de estos factores son producidos por el propio tumor [18]. PEX es una proteína de 210 aminoácidos derivada de la MMP-2 que ha demostrado en estudios in vitro capacidad para inhibir la proliferación de células endoteliales y neoplásicas de los gliomas, así como la migración celular⁴. El objetivo principal del presente estudio fue analizar las diferencias en la expresión de PEX entre las regiones centrales y periféricas de los tumores, así como profundizar en el conocimiento sobre la heterogeneidad de los gliomas.

Nuestros resultados demuestran que existe expresión de PEX los gliomas y en las metástasis cerebrales, y que ésta se relaciona con el grado histológico del glioma pero no con el subtipo celular. Se halló además mayor expresión de PEX en la región central respecto de la periférica en todos los gliomas, pero especialmente en los gliomas de alto grado. Estos resultados concuerdan con los previamente publicados por Bello et al.⁴, quienes demuestran la expresión de PEX incrementa con el grado tumoral en los gliomas.

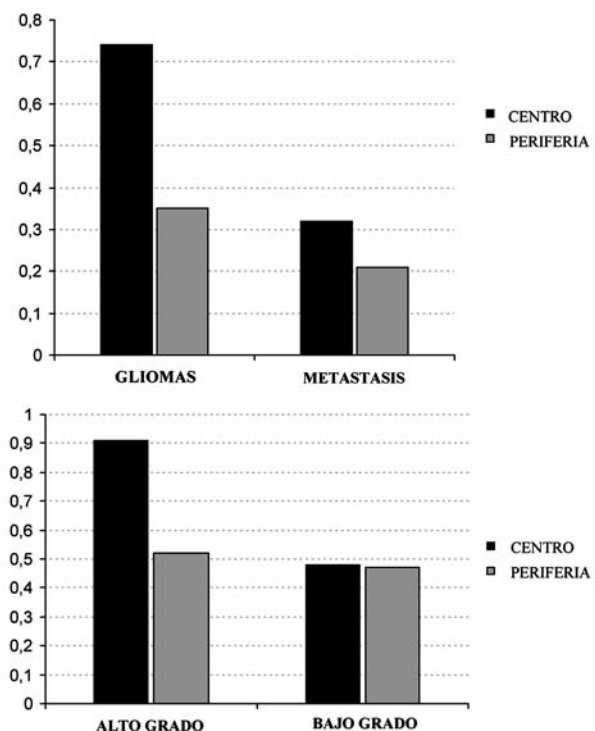


Figura 2: Diferencias intra-tumorales. Expresión de PEX en el centro vs la periferia en gliomas vs metástasis y en gliomas de alto grado vs de bajo grado

		Media	Mediana	Rango
Todos los casos	Centro	0.75	0.67	(0.12-2.39)
	Perifería	0.53	0.35	(0.03-2.17)
Gliomas	Centro	0.82	0.74	(0.12-2.39)
	Perifería	0.51	0.35	(0.06-2.10)
Metástasis	Centro	0.35	0.32	(0.15-0.64)
	Perifería	0.65	0.21	(0.03-2.17)
Tumores astrocitarios	Centro	0.88	0.76	(0.12-2.39)
	Perifería	0.59	0.38	(0.06-2.10)
Tumores oligodendrogiales	Centro	0.67	0.72	(0.13-1.38)
	Perifería	0.33	0.32	(0.08-0.76)
Alto grado	Centro	0.91	0.77	(0.12-2.39)
	Perifería	0.52	0.36	(0.06-2.10)
Bajo grado	Centro	0.48	0.41	(0.13-0.80)
	Perifería	0.47	0.21	(0.08-1.10)

Tabla 4: Expresión de PEX mediante RT-PCR en tiempo real

mas. Este hecho, que podría resultar paradójico, es justificado por los autores, quienes afirman que a pesar de mostrar una mayor expresión de PEX, los gliomas de alto grado son altamente invasivos y angiogénicos porque en ellos los factores inhibidores como PEX se ven superados por otras moléculas con efecto contrario¹⁹.

La existencia, en el seno de los gliomas, de heterogeneidad molecular entre áreas que muestran características histológicas distintas, es un hecho bien conocido y reportado en la literatura. Además, el hecho de que incluso áreas del mismo tumor con idéntica histología puedan presentar cierta heterogeneidad molecular, es un hecho también demostrado²⁰. Así, algunos grupos de investigación han demostrado la existencia de heterogeneidad en el grado de metilación del promotor de MGMT entre distintas áreas del mismo glioma, incluso en ausencia de diferencias morfológicas obvias entre las mismas²¹⁻²³. Mutaciones diferentes de p53 en distintas áreas de un mismo tumor han sido también descritas²⁴. Del mismo modo, la expresión de VEGF, integrina α_5 , vitronectina y tensacina parecen incrementar desde la periferia hacia el centro tumoral⁵. Este es, hasta la fecha, el primer estudio que demuestra la existencia de heterogeneidad intra-tumoral en la expresión de PEX determinada mediante RT-PCR en tiempo real. Esta heterogeneidad no es atribuible a diferencias histológicas entre las distintas áreas del tumor analizadas ya que en todos los casos se realizó en examen

detallado del tejido descartándose diferencias significativas en lo concerniente a aspectos morfológicos, densidad celular, presencia de necrosis y extensión de la misma, proliferación vascular etc.

De entre los procesos biológicos que parecen estar incrementados en el centro de los GBM, van Meter et al.² describen aquellos relacionados con la agresividad tumoral como la sobreexpresión de metaloproteinasas. Al ser PEX un fragmento derivado de la autocatalisis de la MMP-2, la mayor expresión PEX en el centro de estos tumores podría ser en realidad secundaria a la de sobreexpresión MMP-2 en ellos.

La heterogeneidad intratumoral ha sido clasificada por algunos autores en heterogeneidad “región-independiente” (si está presente en todas las áreas del tumor) que aparece durante el desarrollo del tumor, y heterogeneidad “región-dependiente” (como la hallada en la expresión de PEX), que parece originarse como resultado de la progresión del tumor²⁵. Así mismo, se ha señalado la importancia del microambiente tumoral en la expresión genética del mismo, y en los cambios que en ella puedan acontecer. En este sentido, mientras que las células tumorales situadas en el centro de la lesión se encuentran densamente hacinadas y por ser altamente proliferativas pueden experimentar una hipoxia considerable, las células de la periferia del tumor interactúan en mayor medida con la matriz extracelular y con otras células del parénquima cerebral circundante que invaden³.

Estas observaciones refuerzan la teoría de que en los gliomas áreas diferentes del tumor puedan desarrollarse de manera independiente, en contra del concepto clásicamente aceptado del origen monoclonal de estas neoplasias²⁴. Es más, estas diferencias moleculares podrían explicar, al menos en parte, por qué no todas las células de un glioma respondan del mismo modo a la terapias convencionales. Un mejor conocimiento de la heterogeneidad tumoral facilitará el diseño de nuevas estrategias terapéuticas. Además, los resultados del presente trabajo, muestran la necesidad de una planificación cuidadosa y una selección adecuada de la diana quirúrgica en las biopsias tumorales, siendo en ocasiones necesario el análisis de más de una muestra proveniente de distintas áreas del tumor²¹. Son necesarios más estudios para clarificar el significado real de estos hallazgos y su posible relevancia en la práctica clínica diaria.

Bibliografía

- 1 Bellail AC, Hunter SB, Brat DJ, Tan C, Van Meir EG. Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:1046-69.
- 2 Van MT, Dumur C, Hafez N, Garrett C, Fillmore H, Broaddus WC. Microarray analysis of MRI-defined tissue samples in glioblastoma reveals differences in regional expression of therapeutic targets. *Diagn Mol Pathol* 2006;15:195-205.
- 3 Hoelzinger DB, Mariani L, Weis J, et al. Gene expression profile of glioblastoma multiforme invasive phenotype points to new therapeutic targets. *Neoplasia* 2005;7:7-16.
- 4 Bello L, Lucini V, Carrabba G, et al. Simultaneous inhibition of glioma angiogenesis, cell proliferation, and invasion by a naturally occurring fragment of human metalloproteinase-2. *Cancer Res* 2001;61:8730-6.
- 5 Bello L, Francolini M, Marthyn P, et al. Alpha(v)beta3 and alpha(v)beta5 integrin expression in glioma periphery. *Neurosurgery* 2001;49:380-9.
- 6 Park CK, Jung JH, Park SH, Jung HW, Cho BK. Multifarious proteomic signatures and regional heterogeneity in glioblastomas. *J Neurooncol* 2009;94:31-9.
- 7 D'Abaco GM, Kaye AH. Integrins: molecular determinants of glioma invasion. *J Clin Neurosci* 2007;14:1041-8.
- 8 Deryugina EI, Bourdon MA, Luo GX, Reisfeld RA, Strongin A. Matrix metalloproteinase-2 activation modulates glioma cell migration. *J Cell Sci* 1997;110 (Pt 19):2473-82.
- 9 Kim SK, Cargioli TG, Machluf M, et al. PEX-producing human neural stem cells inhibit tumor growth in a mouse glioma model. *Clin Cancer Res* 2005;11:5965-70.
- 10 Brooks PC, Silletti S, von Schalscha TL, Friedlander M, Cheresch DA. Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity. *Cell* 1998;92:391-400.
- 11 Brooks PC, Stromblad S, Sanders LC, et al. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell* 1996;85:683-93.
- 12 Benny O, Duvshani-Eshet M, Cargioli T, et al. Continuous delivery of endogenous inhibitors from poly(lactic-co-glycolic acid) polymeric microspheres inhibits glioma tumor growth. *Clin Cancer Res* 2005;11:768-76.
- 13 Santandreu FM, Brell M, Gene AH, et al. Differences in mitochondrial function and antioxidant systems between regions of human glioma. *Cell Physiol Biochem* 2008;22:757-68.
- 14 The WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System. 4th edn. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2007.
- 15 Larionov A, Krause A, Miller W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics* 2005;21:62.
- 16 Tchirkov A, Rolhion C, Kemeny JL, et al. Clinical implications of quantitative real-time RT-PCR analysis of hTERT gene expression in human gliomas. *Br J Cancer* 2003;88:516-20.
- 17 Valente V, Teixeira SA, Neder L, et al. Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative RT-PCR. *BMC Molecular Biology* 2009;10:17.
- 18 Pluderi M, Lucini V, Caronzolo D, et al. Long-term inhibition of glioma growth by systemic administration of human PEX. *J Neurosurg Sci* 2003;47:69-78.
- 19 Tate MC, Aghi MK. Biology of angiogenesis and invasion in glioma. *Neurotherapeutics* 2009;6:447-57.
- 20 Walker C, du Plessis DG, Joyce KA, et al. Phenotype versus genotype in gliomas displaying inter- or intratumoral histological heterogeneity. *Clin Cancer Res* 2003;9:4841-51.
- 21 Dunn J, Baborie A, Alam F, et al. Extent of MGMT promoter methylation correlates with outcome in glioblastomas given temozolomide and radiotherapy. *Br J Cancer* 2009;101:124-31.
- 22 Jullierat-Jeanerret L, Chapuis Bernasconi C, Bricod C, et al. Heterogeneity of human glioblastoma: glutathione-S-transferase and methylguanine-methyltransferase. *Cancer Invest* 2008;26:597-609.
- 23 Parkinson JF, Wheeler HR, Clarkson A, et al. Variation of O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT) promoter methylation in serial samples of glioblastoma. *J Neurooncol* 2008;87:71-8.
- 24 Ren ZP, Olofsson T, Qu M, et al. Molecular genetic analysis of p53 intratumoral heterogeneity in human astrocytic brain tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007;66:944-54.
- 25 Harada K, Nishizaki T, Ozaki S, Kubota H, Ito H, Sasaki K. Intratumoral cytogenetic heterogeneity detected by comparative genomic hybridization and laser scanning cytometry in human gliomas. *Cancer Res* 1998;58:4694-700.