

---

TRABAJO DE FIN DE GRADO CURSO 2020-21 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

---

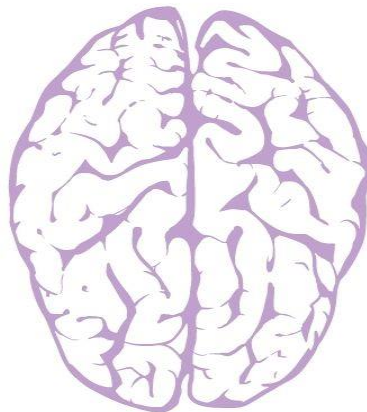
---

**EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS  
DE ESTUDIOS DE NEUROIMAGEN DEL  
GLIOBLASTOMA  
EN RELACIÓN CON EL RECEPTOR DE  
ANDRÓGENOS**

---

**Grado en Medicina**

---



**AUTORES**

---

**Sara del Carmen Reyes Díaz  
Nadia María Curbelo Ascanio**

---

**TUTOR Y COTUTOR**

---

**José Luis González Mora**  
Dpto. Ciencias Médicas Básicas, ULL

**Julio Manuel Plata Bello**  
Servicio de Neurocirugía,  
Hospital Universitario de Canarias

---

*‘Evaluación de las características de estudios de neuroimagen del glioblastoma en  
relación con el receptor de andrógenos’*

# ÍNDICE

<b>1. Resumen</b>	4
<b>2. Abstract</b>	5
<b>3. Introducción</b>	6
3.1. Clasificación del glioblastoma	6
3.2. Diagnóstico del glioblastoma: importancia de los estudios de imagen	8
3.3. Papel del receptor de andrógenos en el glioblastoma	10
<b>4. Objetivos</b>	11
<b>5. Material y métodos</b>	12
5.1. Diseño del estudio	12
5.2. Sujetos del estudio	12
5.3. Análisis volumétrico de los estudios de imagen	13
5.4. Tamaño muestral	14
5.5. Variables del estudio	14
5.6. Recogida y procesado de datos	15
5.7. Análisis de metilación MGMT	15
5.8. Análisis de RPPA	16
5.9. Inferencia de la actividad del RA (AR-score)	16
5.10. Análisis estadístico	16
<b>6. Resultados</b>	17
6.1. Características de los pacientes incluidos en el estudio	17
6.2. Comparación entre pacientes con baja y alta expresión del receptor de andrógenos	18
6.3. Comparación entre pacientes con baja y alta actividad del receptor de andrógenos	20
6.4. Evaluación pronóstica de la expresión de RA y AR-score (análisis de supervivencia)	22
6.5. Relación entre las variables volumétricas y AR-score	23
<b>7. Discusión</b>	24
<b>8. Conclusión</b>	28
<b>9. ¿Qué hemos aprendido?</b>	29
<b>10. Bibliografía</b>	30 - 33

# 1. RESUMEN

**Introducción:** El glioblastoma es el tumor primario más común del sistema nervioso central. Una mayor actividad del receptor de andrógenos se ha asociado previamente con un peor pronóstico de este tumor, pero no se ha establecido una relación entre la actividad del receptor de andrógenos (RA) y las características de imagen.

**Objetivo:** Identificar la relación entre la expresión y actividad del RA en el tejido del glioblastoma y las características de la resonancia magnética (RM) prequirúrgica.

**Material y métodos:** Para este estudio se utilizaron datos de The Cancer Genome Atlas (TCGA) y The Cancer Imaging Archive (TCIA). Solo se seleccionaron pacientes con datos de proteínas y RM prequirúrgica. Los datos de ambas bases de datos se combinaron y analizaron estadísticamente. Los volúmenes de realce tumoral, necrosis y edema T2/FLAIR se estimaron utilizando la plataforma en línea OncoHabitats, que utiliza redes neuronales convolucionales de aprendizaje profundo. La actividad RA se determinó calculando el AR-score, un índice calculado mediante el uso de la expresión (a nivel de ARN) de 13 genes de respuesta a andrógenos, que se ha validado previamente en otras líneas celulares cancerosas. Se realizó un análisis comparativo entre pacientes con AR-score alto o bajo (utilizando p50 como umbral). Se realizaron análisis bivariados de correlación y supervivencia.

**Resultados:** Se incluyeron 47 pacientes (22 mujeres; edad media 55,5 años [DE = 14,32]). Los pacientes con AR-score más alto presentaron peor SG que aquellos con AR-score bajo (15,87 vs. 29,63 meses;  $p = 0,004$ ). El análisis de regresión lineal mostró una relación negativa entre el AR-score y el volumen de necrosis (Beta=-0,411;  $p = 0,03$ ). Ninguna otra característica de imagen se asoció con el AR-score. No se encontró asociación entre la expresión de RA y los volúmenes tumorales.

**Conclusión:** Existe una relación negativa entre el volumen de necrosis y la actividad de RA. Ningún otro volumen tumoral muestra asociación ni con expresión RA ni actividad RA.

## **Palabras Clave:**

**Glioblastoma (GB); Receptor de andrógenos (RA); Resonancia Magnética (RM); AR-Score; Supervivencia Global (SG).**

## 2. ABSTRACT

**Background:** Glioblastoma is the most common primary tumor of the central nervous system. A higher androgen receptor activity has been previously associated with a worse prognosis of this tumor, but no relationship has been established between the androgen receptor (AR) activity and imaging features.

**Aim:** The aim of the present work is to identify any relationship between the androgen receptor expression and activity in glioblastoma tissue and the presurgical magnetic resonance imaging (MRI) features.

**Methods:** Data from The Cancer Genome Atlas (TCGA) and The Cancer Imaging Archive (TCIA) were used for this study. Only patients with protein data and presurgical MRI were selected. Data from both databases was combined and statistically analyzed. Contrast-enhanced tumor, necrosis and T2/FLAIR edema volumes were estimated using the online platform OncoHabitats, that uses deep learning convolutional neural networks. The AR-activity was determined by calculating the AR-score, an index calculated by using the expression (at RNA-level) of 13 androgen-responsive-genes, which has been previously validated in other cancer cell lines. Comparative analysis between patients with high or low AR-score (using p50 as threshold) was performed. Bivariate correlation and survival analysis were done.

**Results:** Forty-seven patients (22 women; mean age 55.5 years [SD=14.32]) were included in the study. Patients with higher AR-score presented a worse OS than those with low AR-score (15.5 vs. 29.6 months;  $p=0.017$ ). Linear regression analysis showed a negative relationship between the AR-score and the necrosis volume (Beta=-0.411;  $p=0.03$ ). No other imaging feature was associated with the AR-score. No association between AR expression and tumoral volumes was found.

**Conclusion:** There is a negative relationship between necrosis volume and AR activity. No other tumor volume shows association nor with AR expression neither AR activity

### **Keywords:**

**Glioblastoma (GB); Androgen Receptor (AR); Magnetic Resonance (MR); AR-Score; Overall Survival (OS).**

### 3. INTRODUCCIÓN

El glioblastoma (GB) es el tumor cerebral primario más frecuente y agresivo en adultos, comprendiendo el 45% de todos los tumores malignos del sistema nervioso central (SNC) y el 80% de los tumores malignos primarios del SNC (1). Son tumores mitóticamente activos caracterizados por la proliferación microvascular y la presencia de necrosis, características morfológicas que lo posicionan en el grado IV de la clasificación de tumores cerebrales por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (2, 3). En cuanto a su origen, existe la hipótesis centrada en ciertas alteraciones genéticas que afectan a las células madre o progenitoras de la neuroglia (4). Además, su localización habitualmente se limita a la región supratentorial (lóbulos frontal, temporal, parietal y occipital) y rara vez se localiza en el cerebelo (2).

Se trata de un tumor cerebral intrínseco cuya mediana de edad en el momento de su diagnóstico se encuentra en los 65 años, aunque puede ocurrir a cualquier edad (2). En países desarrollados, la incidencia anual ajustada por edad aumenta con los años, observándose que el GB en adultos es más frecuente en números absolutos que la forma infantil (0,15 por 100.000 en niños, 0,41 en adultos jóvenes hasta el pico de 15,03 por 100.000 en pacientes de 75 a 84 años) (3). Los hombres se ven afectados aproximadamente 1,7 veces más que las mujeres (1, 2, 3, 5, 6). Por otro lado, la incidencia de esta neoplasia es 2,0 veces mayor en caucásicos en comparación con otras etnias, con menor incidencia en los asiáticos y los nativos americanos (3, 5).

#### 3.1 Clasificación del Glioblastoma

Podemos diferenciar dos subtipos de GB: el GB "primario" y el "secundario". El GB primario generalmente se presenta de *novo*, mientras que el GB secundario se trata del resultado de la progresión molecular y el aumento del grado de malignidad de un glioma de grado inferior (II-III de la OMS) con el tiempo (7). Uno de los descubrimientos más importantes resultantes de estudios genómicos de alto rendimiento que ha modificado nuestra comprensión de los glioblastomas fue la identificación de mutaciones en las enzimas metabólicas isocitrato deshidrogenasa 1 y 2 (IDH1/2) (3). Hasta el descubrimiento de las mutaciones de IDH1/2 como marcador molecular, la distinción entre GB primarios y secundarios se basaba en observaciones clínicas (6). Previamente, los GB se han clasificado sobre la base de perfiles de expresión de ADNc, con patrones distintivos proneural, clásico, mesenquimal y proliferativo (6). En 2010, la subclasificación del GB basada en la expresión génica sugerida inicialmente se refinó aún

más utilizando 601 genes y datos de secuencia de 91 pacientes, lo que arrojó cuatro subtipos designados como proneural, neural, clásico y mesenquimal, según las similitudes con el perfil de expresión génica conocido (3, 8). Posteriormente, en 2012, el perfil epigenético arrojó una clasificación de hasta seis subtipos (3).

Es en 2016 que los GB son clasificados de nuevo por la OMS como: glioblastoma, IDH-*wildtype* (aproximadamente 90% de los casos), que corresponde más frecuentemente con el previo clínicamente definido primario o de *novo* y predomina en los pacientes de más de 55 años de edad; glioblastoma IDH-mutado (aproximadamente 10% de los casos), que se corresponde estrechamente con el antes denominado glioblastoma secundario con antecedente de glioma difuso de bajo grado previo, surgiendo preferentemente en pacientes más jóvenes (véase la **Tabla 1**); y glioblastoma NOS, un diagnóstico que se reserva para aquellos tumores para los que no se puede realizar una completa evaluación de IDH (9).

<b>Tabla 1. Características diferenciales entre Glioblastoma IDH-<i>Wildtype</i> y Glioblastoma IDH-mutado</b>		
	<b>Glioblastoma IDH-<i>Wildtype</i></b>	<b>IDH-mutado</b>
Sinónimos	Glioblastoma primario, IDH- <i>wildtype</i>	Glioblastoma secundario, IDH-mutado
Lesión precursora	No identificable, Desarrollo de <i>novo</i>	Astrocitoma difuso Astrocitoma anaplásico
Proporción de Glioblastomas	~ 90%	~ 10%
Edad media al diagnóstico	~ 62 años	~ 44 años
Ratio Hombre: Mujer	1.42: 1	1.05 :1
Supervivencia global media		
- Cirugía + RT	9.9 meses	24 meses
- Cirugía + RT + QT	15 meses	31 meses
Localización	Supratentorial	Preferentemente frontal
Necrosis	Extensa	Limitada
Mutaciones en el promotor TERT	72%	26%
Mutaciones en TP53	27%	81%
Mutaciones en ATRX	Excepcional	71%
Amplificación EGFR	35%	Excepcional
Mutaciones en PTEN	24%	Excepcional

Adaptada de: 'Key characteristics of IDH-wildtype and IDH-mutant glioblastomas' extraído de: 'The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System' por Louis et al. (2016) (9)

En cuanto a los factores pronósticos de esta neoplasia, los más concluyentes y mejor replicados son la extensión de la resección del tumor, la edad en el momento del diagnóstico y el estado funcional de Karnofsky (KPS). Así como varios marcadores tumorales de gran importancia clínica, especialmente la mutación de la isocitrato deshidrogenasa 1/2 (IDH1 / 2) y metilación de O-6-metilguanina-ADN metiltransferasa (MGMT) (10). Se ha expuesto que mutaciones IDH1 e IDH2 están asociadas con un pronóstico favorable y un tiempo de supervivencia global prolongado independientemente del tratamiento. Por otro lado, MGMT es una enzima de reparación de ADN que protege a las células contra el daño de la radiación ionizante y los agentes alquilantes. Una proporción significativa de glioblastomas expresa niveles reducidos de MGMT, lo que hace que estos tumores sean más susceptibles a los efectos de los agentes alquilantes. Como consecuencia, las células de GB con (hiper)metilación del promotor MGMT responden mejor a la Temozolomida (TMZ), tratamiento estándar actual. Además, la identificación de amplificaciones y mutaciones de EGFR, especialmente EGFRvIII, se ha asociado con un peor pronóstico y en general se considera indicativa de alto grado de malignidad (11,5).

En la actualidad, el tratamiento estándar incluye resección máxima segura seguida de Radioterapia y Temozolomida (TMZ) concomitante seguida de TMZ de mantenimiento durante 6-12 meses (1, 10). No obstante, la mediana de supervivencia global para los pacientes recién diagnosticados es de 12-18 meses, de forma que pocos pacientes sobreviven más allá de los 2,5 años y menos del 5% superan los 5 años de supervivencia tras el diagnóstico (5), estimándose que los supervivientes a largo plazo (LTS) sólo viven aproximadamente entre 18 meses y 5 años después del diagnóstico, con riesgo de secuelas neurocognitivas y psicológicas (12). Comprobándose que, a pesar de la investigación y tratamientos actuales, no ha habido una mejoría ni un cambio claro en el pronóstico de esta enfermedad en la última década (1).

### **3.2. Diagnóstico del glioblastoma: Importancia de los estudios de imagen**

La presentación clínica de un paciente con GB puede variar mucho según el tamaño, la ubicación del tumor y las estructuras anatómicas cerebrales afectadas (13). La destrucción tisular y el edema también contribuyen a los síntomas clínicos y provocan un rápido deterioro en algunos pacientes (3). Con ello, los pacientes suelen presentar síntomas relacionados con el aumento de la presión intracraneal, que incluyen cefalea y déficits neurológicos focales o progresivos, siendo la epilepsia una forma de presentación en hasta el 25% de los pacientes y puede presentarse en una etapa posterior de la enfermedad en hasta el 50% (13).



La técnica de imagen de elección para el estudio del GB es la Resonancia Magnética (RM) (14). Ante el diagnóstico de GB, por lo general, se recomienda realizar una cirugía citoreductora máxima como tratamiento estándar inicial. Los neurocirujanos a menudo utilizarán la RM de alta resolución para la planificación quirúrgica y la guía intraoperatoria, así como para determinar la agresividad de la resección en función del riesgo de daño sobre las regiones elocuentes cercanas (15).

En el estudio estándar, generalmente se solicita una RM con contraste, con secuencias potenciadas en T2 (*T2-weighted*), *T2-fluid-attenuated inversion recovery* (T2-FLAIR), ECO gradiente, potenciadas en T1 (*T1-weighted*) y *T1-weighted* realizada por contraste (T1CE). Muchas instituciones también capturan secuencias T2w eco gradiente y potenciadas en difusión (15). En la RM, los GB aparecen como masas con realce de contraste en su margen como un correlato de ruptura de la barrera hematoencefálica, hiperintensidad central en imágenes ponderadas en T2 como correlato de necrosis e hiperintensidad perifocal en *T2-weighted* y T2-FLAIR como un correlato de edema (3). La hemorragia y la distorsión o desplazamiento ventricular también pueden estar presentes (13). Se ha establecido bien que la infiltración tumoral microscópica generalmente se extiende más allá de la anomalía de la señal visualizada en la RM (13). Los estudios de anatomía patológica demuestran una infiltración tumoral microscópica a lo largo del edema peritumoral, que aparece hiperintenso en las secuencias T2-FLAIR. Más del 90% de las recurrencias tumorales ocurrirán dentro de esta envoltura T2-FLAIR (15).

Las características de imagen extraídas de secuencias de RM preoperatorias estándar y avanzadas a través de métodos computacionales avanzados han mostrado evidencia para predecir la supervivencia, el subtipo molecular y el estado mutacional en el GB, lo que puede mejorar potencialmente el conjunto de biomarcadores en imagen disponibles (15).

Este desarrollo reciente en el campo de la RM y de sus implicaciones han estimulado la necesidad de ahondar en la búsqueda de nuevas relaciones potenciales entre el perfil molecular del GB junto con la información obtenida mediante la RM. Se trata de un área de gran interés que puede contribuir sustancialmente a la selección de las alternativas terapéuticas más adecuadas para cada paciente.

### 3.3. Papel del Receptor de Andr6genos en Glioblastoma

El sistema nervioso central (SNC) es un objetivo importante para los esteroides sexuales como los estr6genos y los andr6genos. Estas hormonas juegan un papel importante en el desarrollo cerebral, crecimiento, maduraci3n, diferenciaci3n y funci3n de las c3lulas cerebrales, as3 como comportamientos sexuales, agresivos y reproductivos, adem3s del desarrollo del lenguaje (16, 17). De igual manera, pueden estar implicadas en diversos trastornos neurol6gicos y neoplasias (18). As3 pues, desde el SNC se puede sintetizar hormonas esteroideas a partir del colesterol, proceso conocido como neurosteroidog3nesis, que actúan en la formaci3n de sinapsis, la supervivencia neuronal y la proliferaci3n de astrocitos (19), entre otras funciones. En la actualidad, el estudio de las funciones de los neuroesteroides en el SNC se ha extendido a los tumores cerebrales, principalmente a los GB ejerciendo una variedad de acciones importantes en la progresi3n de la neoplasia a trav3s de la promoci3n de acciones de proliferaci3n, migraci3n e invasi3n (20).

El receptor de andr6genos (RA) (NR3C4, subfamilia de receptores nucleares 3, grupo C, gen 4) pertenece al grupo de receptores nucleares de hormonas esteroideas. Se trata de un factor de transcripci3n dependiente de ligando en el que su uni3n a sus ligandos nativos (5 $\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT) y testosterona (T)) controla la expresi3n de genes espec3ficos (21).

La importancia del papel oncog3nico entre receptores esteroides sexuales y los tumores cerebrales fue descrito por primera vez en 1983, cuando ya se hab3a establecido el rol del RA en c3nceres como el de pr3stata o mama (22). En este sentido, existen algunas evidencias de que el RA se activa y expresa en c3lulas de GB. Recientemente, se ha demostrado una expresi3n significativa de RA en GB en comparaci3n con cerebro sano (18). Fue en 2017 por Bao et al. cuando se realiz3 el primer estudio sobre la relaci3n de los niveles de Testosterona (T) y el GB, observ3ndose niveles elevados en los afectados por esta neoplasia (23). A partir de estos resultados, este estudio sugiri3 la posible relaci3n de la actividad del RA en la proliferaci3n del GB (20). As3 pues, los estudios en relaci3n con la expresi3n y actividad del RA en GB cada vez cobran mayor importancia y refuerzan m3s la idea de una posible implicaci3n de este, como se observa en c3nceres tales como el de pr3stata o mama.

Otros autores actuales han seńalado el importante papel de la presencia del RA en la supervivencia de GB. En concreto, el estudio de Zalzman N., et al. realizado en 2018, ha mostrado que el silenciamiento gen3tico e inhibici3n farmacol3gica del RA induce la muerte

celular del GB in vivo e in vitro. Además, describe la relación entre la expresión de RA y la agresividad del tumor a través de los hallazgos que mostraban una correlación negativa entre la expresión de RA y la puntuación en la escala de Karnofsky (22). Rodríguez-Lozano et al. (2020) también ha demostrado que tanto la T como la DHT promueven la migración e invasión de líneas celulares de GB humanas, sugiriendo que el metabolismo de la T en DHT mediado por las dos isoenzimas de 5 $\alpha$ R es crítico para la progresión del GB (24).

Así pues, atendiendo a la literatura científica desarrollada hasta el momento, en cuanto a la relación del RA con el GB, sugerimos investigar e integrar la posible relación existente entre los datos obtenidos de imagen de RM y de expresión y actividad del RA en pacientes con GB, cuestión que hasta el momento no se ha abordado en la literatura. Debido al mal pronóstico que presenta esta neoplasia, estudios de estas características proporcionan una gran oportunidad para contribuir al conocimiento de biomarcadores en imagen, lo que puede llegar a ser de gran utilidad en el contexto del paciente con GB, por su valor en la obtención de una perspectiva pronóstica más definida, así como su uso para la toma de decisiones clínicas.

## **4. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO PRINCIPAL**

Este estudio tiene como objetivo principal analizar y describir la relación entre las características de imagen de RM y la expresión y actividad del RA en el GB en términos de supervivencia global.

### **OBJETIVOS SECUNDARIOS**

- Determinar el valor pronóstico, en términos de supervivencia global, de la expresión del RA y actividad del RA en el GB asociado a los diferentes volúmenes tumorales determinados en estudios de RM (captación de contraste -realce tumoral-, necrosis, edema).
- Analizar la relación entre la expresión y actividad del RA en el GB y los diferentes volúmenes tumorales.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1. Diseño del estudio

Planteamos un estudio de carácter observacional retrospectivo de una cohorte de pacientes con diagnóstico de GB en el que se analizan la relación existente entre los volúmenes tumorales determinados a partir del estudio de RM prequirúrgico con la expresión y/o actividad del RA.

### 5.2. Sujetos del estudio

Se ha empleado la base de datos The Cancer Genome Atlas (TCGA) (<https://www.cancer.gov/>) y su base de datos asociada The Cancer Imaging Archive (TCIA) (<https://www.cancerimagingarchive.net>). Estas bases de datos, cuya información es de acceso libre para su uso en investigación, incluye imágenes de resonancia magnética y datos clínicos y moleculares respectivamente, de pacientes con GB, entre otros tumores.

A la hora de seleccionar los pacientes que se han incluido en el estudio, se han considerado los siguientes criterios:

#### **Criterios de Inclusión:**

- Pacientes con GB incluidos en la base de datos del TCGA y TCIA.
- Pacientes con GB primario (IDH1 y 2 *wildtype*).
- Pacientes con datos de expresión de proteína disponibles

#### **Criterios de exclusión:**

- Pacientes en los que su estudio de imagen de RM prequirúrgico no incluya todas las secuencias estándar: imágenes potenciadas en T1 con y sin gadolinio, potenciadas en T2 y secuencia FLAIR.
- Pacientes con estudio de imagen de RM prequirúrgico disponible en los que existan problemas en el análisis morfológico de segmentación.

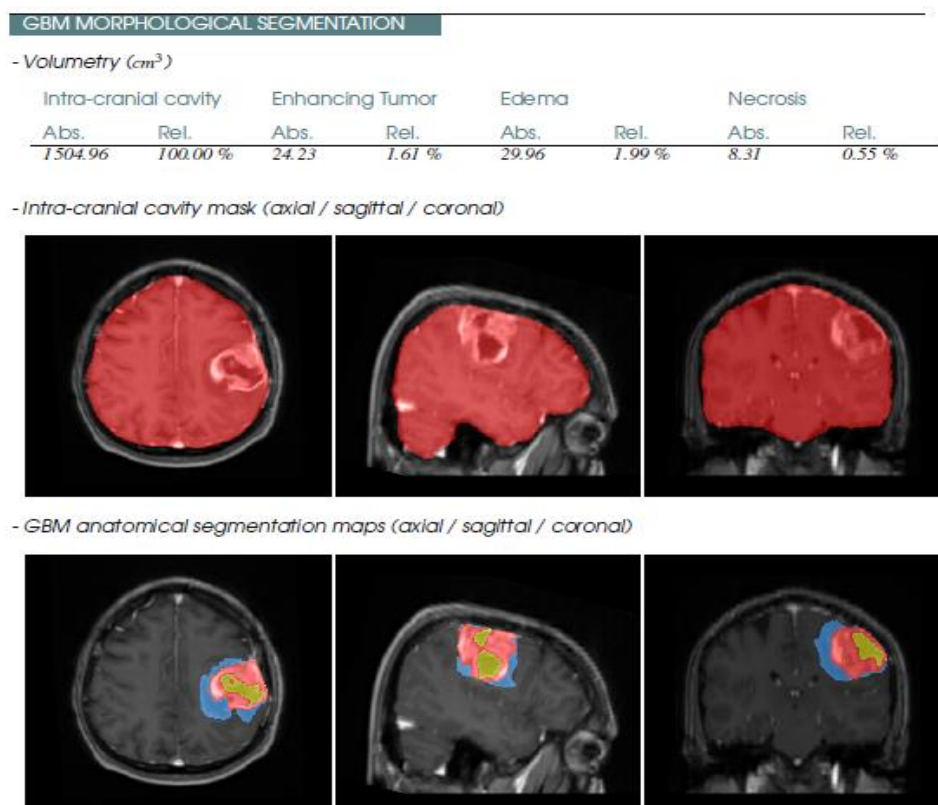
Se parte de un total de 262 pacientes contenidos en la base de datos TCIA. De ellos contamos con 106 pacientes a los que se les ha realizado un análisis de expresión proteica en la muestra tumoral. Se ha accedido a sus datos de estudio de RM, revisando cuales contenían todas las secuencias de RM de interés a estudio (T1, T1C, T2 y FLAIR), descartando 51

pacientes cuyos estudios no cumplían estos requisitos. Una vez concluido, contamos con un total de 55 pacientes para analizar las características de imagen.

### 5.3. Análisis volumétrico de los estudios de imagen

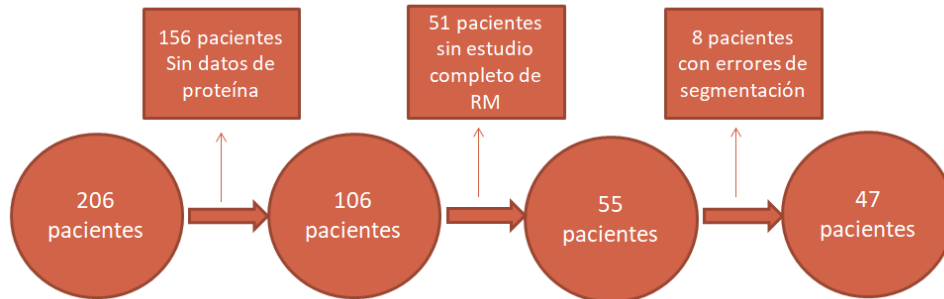
El análisis de las características de imagen se llevó a cabo mediante la plataforma en línea OncoHabitats (<https://www.oncohabitats.upv.es/>) (25). OncoHabitats es una tecnología de análisis de imagen que utiliza redes neuronales convolucionales de aprendizaje profundo que, a través de RM multiparamétricas adquiridas en la práctica clínica diaria, describe los diferentes subcompartimentos que delimita en el tumor activo y en el edema (26).

Para obtener las variables volumétricas, la plataforma requirió la introducción de los estudios de imagen de cada paciente, específicamente las potenciaciones T1 pre y post Gadolinio, potenciación T2 y secuencia FLAIR. Posteriormente, la plataforma realiza un análisis morfológico de segmentación y envía los resultados obtenidos con las variables volumétricas: volumen de realce tumoral, de edema y de necrosis tumoral determinados en centímetros cúbicos (CC). A modo de ejemplo, puede observarse uno de los resultados obtenidos en la **figura 1**.



**Figura 1.** Ejemplo de informe de segmentación de sujeto tcga-08-0358, producido por la plataforma en línea OncoHabitats.

Tras el análisis de todos los pacientes, un total de 8 no eran admitidos o producían errores de segmentación. Finalmente, contamos con un total de 47 pacientes del TCIA con datos de proteína disponible, los estudios de RM requeridos y con estudio de segmentación adecuado. (Véase figura 2)



**Figura 2.** Diagrama de flujo en el que se describe el proceso de selección de los sujetos del estudio.

## 5.4. Tamaño muestral

Se realizó un muestreo de conveniencia, seleccionando los pacientes recogidos en la base de datos del TCIA y TCGA que cumplieran los criterios de inclusión y ninguno de exclusión mencionados anteriormente. Se conformó una base de datos con una cohorte de 47 pacientes, creando la base de datos definitiva para su posterior análisis.

## 5.5. Variables del estudio

### Principal:

- Supervivencia global en meses (SG)

### Secundarias:

- Expresión de receptor de andrógenos a nivel de proteína
- Actividad del receptor de andrógenos (AR-score)
- Volumen de captación de gadolinio (realce tumoral)
- Volumen de necrosis
- Volumen de edema
- Variables demográficas (edad, sexo)
- Otras variables clínicas (índice de Karnofsky, tratamiento (uso de radioterapia, Temozolomida, Bevacizumab, etc.))
- Otras variables moleculares (mutación IDH, metilación MGMT)

## 5.6. Recogida y procesado de datos

Para la recogida de datos se accedió a la base de datos TCGA y a su base de datos asociada TCIA. Se trata de un registro de datos clínicos y moleculares de más de 11.000 pacientes con diferentes neoplasias a lo largo de los últimos trece años. En dicho registro se incluyen datos clínicos y moleculares completamente anonimizados cuya información es de acceso libre para su uso en investigación. Este estudio se ha llevado a cabo cumpliendo con los requerimientos del TCGA para la publicación de información procedente de dicha base de datos (<https://www.cancer.gov/>). Se realizó la descarga de los datos procedentes del TCGA a través de Firebrowse (<http://firebrowse.org/>) (versión de datos TCGA 28-01-2016). Los estudios de imagen de RM recogidos en el TCIA se descargaron a través de su plataforma (<https://www.cancerimagingarchive.net/>).

Las imágenes de RM obtenidas se visualizaron mediante RadiAnt DICOM Viewer™, donde se comprobó si los pacientes contaban con las secuencias descritas previamente. Posteriormente, se procedió a realizar el análisis y segmentación de los estudios de imagen a través de la plataforma en línea OncoHabitats, para obtener las variables volumétricas de interés, tal y como se ha explicado previamente.

## 5.7. Análisis de metilación de MGMT

De la cohorte de pacientes del TCGA que fueron incluidos en el presente estudio, 41 pacientes presentaban datos de metilación disponibles, habiéndose empleado la plataforma Human Methylation 450 (HM450). Para determinar la metilación de la enzima MGMT se realizó según lo descrito en estudios previos (27, 28). Por un lado, se transformó los valores beta en valores M usando la siguiente fórmula:

$$\# M = \log_2 (\text{Beta}/(1-\text{Beta})) \quad 14$$

Posteriormente, calculamos el  $\text{logit}(y)$  empleando el modelo propuesto por Bady et al (2012) (26), donde únicamente se tuvo en cuenta el valor M de dos islas CpG de MGMT (cg12434587 and cg12981137):

$$\#\text{logit}(y) = 4,3215 + 0,5271 * \text{cg12434587} + 0,9265 * \text{cg12981137}$$

A partir de lo propuesto por Bady et al. (2012), el punto de corte para maximizar la suma de la sensibilidad y especificidad es de 0.358 (27), utilizándose este para indicar los pacientes que mostraban o no metilación de MGMT.

## **5.8. Análisis de expresión del RA**

Para la obtención de la expresión proteica del RA se descargaron los datos de la plataforma TCGA. Estos datos mostraron una distribución normal (Kolmogórov-Smirnov;  $p=0.089$ ). Además, se dicotomizó utilizando la mediana ( $p50=0.026$ ) y se utilizó la expresión de RA para comparar tanto grupos de baja ( $\leq p50$ ) como de alta ( $> p50$ ) expresión del RA.

## **5.9. Inferencia de la actividad del RA (AR-score)**

Para la obtención de la actividad del receptor de andrógenos se generó un índice que incluía el nivel de expresión de genes de respuesta a andrógenos (ARGs) a nivel de RNA, que habían sido previamente validados (29). Este índice se ha denominado, al igual que otros trabajos de nuestro grupo, AR-score (30, 31). Así pues, se elaboró una lista de 13 genes que son inducidos por la activación del RA tanto en las líneas celulares HPr-1ar (linaje de células prostáticas normales) como por LNCaP (linaje de células prostáticas cancerígenas). Además, se calculó un Z-score para la expresión de cada gen de cada muestra mediante la sustracción de la media acumulada de los valores de expresión de RNAseq y se dividió por la desviación estándar acumulada. La actividad del RA (AR-score) para cada muestra es computada como la suma de los Z-scores de los ARGs seleccionados. El AR-score mostró una distribución normal (Kolmogórov-Smirnov;  $p=0.115$ ). Asimismo, empleando la mediana ( $p50=-0.46$ ), también se dicotomizó y se empleó la expresión del AR-score para comparar los grupos de bajo ( $\leq p50$ ) y alto ( $> p50$ ) AR-score.

## **5.10. Análisis estadístico**

Se emplearon test estadísticos no paramétricos (U de Mann-Whitney para variables continuas y Chi-Cuadrado / Prueba exacta de Fisher para variables discretas) para identificar diferencias entre los grupos de baja y alta expresión del RA, al igual que entre los grupos de bajo y alto AR-score. Se consideró la significación estadística cuando  $p\text{-valor}<0.05$ .

Se realizaron análisis de regresión de Cox uni y multivariados, en los que se incluyeron variables clínicas, moleculares y de imagen en el análisis univariado, y se añadieron al modelo multivariado aquellas con un  $p\text{-valor}<0.05$ . También, se utilizaron las pruebas de Mantel – Cox y de Kaplan-Meier para estudiar las diferencias de supervivencia global entre los grupos de diferente expresión de AR y AR-score. La significación estadística para el análisis de supervivencia se consideró cuando  $p\text{-valor}<0.05$ .



## 6. RESULTADOS

### 6.1. Características de los pacientes incluidos en el estudio

Se han incluido un total de 47 pacientes (22 mujeres) con una edad media de 55.51 años (DE= 14.32). De ellos, 37 recibieron el tratamiento postquirúrgico estándar del GB, consistente en radioterapia + Temozolomida. El resto de los datos clínicos de los pacientes incluidos en el estudio están registrados en la **Tabla 2** (continuación en página 18).

El volumen medio de realce tumoral fue de 26.92 cc (DE=19.01), volumen medio de edema 62.91 cc (DE=35.63) y volumen medio de necrosis 11.00cc (DE=11.44).

En cuanto a la supervivencia libre de progresión, se calcula, en esta cohorte de pacientes, una mediana de 9.27 meses con un intervalo de confianza al 95% [7.02 - 11.15], y una supervivencia global de 16.17 meses con un intervalo de confianza al 95% [13.04 - 19.2]. Por lo tanto, se ha reportado una supervivencia que coincide dentro de los rangos aproximados descritos en la literatura sobre GB.

**Tabla 2. Características clínicas, moleculares y de imagen de los pacientes incluidos en el estudio**

Edad	55.51 (DE=14.32)	
Sexo (Hombre: Mujer)	25:22	
Escala de rendimiento de Karnofsky <80 (n =45)	14 (31.1%)	
Metilación del promotor MGMT (n=41)	23 (56.1%)	
Expresión proteica del RA (RPPA)	0.0459 (DE=.3915)	
AR-Score (n=27)	-0.28 (DE=6.84)	
Fracción del genoma alterada (n=45)	0.22 (DE=0.15)	
Grado/Score de aneuploidía (n=44)	13.14 (DE=20.37)	
Recuento de mutaciones (n=47)	56.28 (DE=74.67)	
Tratamiento adyuvante	No	10 (21.3%)
	RT+TMZ	37 (78.7%)
Tratamiento con Bevacizumab	No	35 (74.5%)
	Si	12 (25.5%)
Volumen de realce tumoral (cc)	26.92 (DE=19.01)	
Volumen de Edema (cc)	62.91 (DE=35.63)	
Volumen de necrosis (cc)	11.00 (DE=11.44)	
Ratio Necrosis / realce tumoral	0.40 (DE=0.32)	
Ratio realce tumoral / Edema	0.53 (DE=0.41)	
Ratio Necrosis / Edema	0.21 (DE=0.24)	
Supervivencia libre de progresión (meses [95% I.C.])	9.27 [7.02 – 11.52]	
Supervivencia global (SG) (meses [95% I.C.])	16.17 [13.04 – 19.29]	

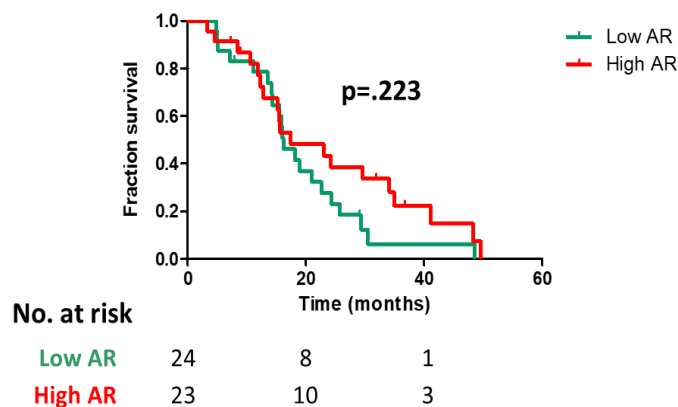
## Abreviaturas

RM: Resonancia magnética  
 RA: Receptor de andrógenos  
 MGMT: O6Metilguanina-DNA metil-transferasa  
 RT: Radioterapia  
 CC: Centímetros cúbicos  
 DE: Desviación estándar  
 TMZ: Temozolamida  
 I.C: Intervalo de confianza

## 6.2. Comparación entre pacientes con baja y alta expresión de Receptor de Andrógenos

Los datos de expresión del RA a nivel de proteína mostraron una expresión media normalizada de 0.0459 (DE=0.3915) en las muestras de GB. Se realizó un análisis comparativo entre pacientes con una baja ( $\leq p50$ ) y una alta ( $p > 50$ ) expresión de RA.

En el grupo de baja expresión de RA se observó mayor volumen de realce tumoral (27.3 cc vs 26.5 cc), mayor volumen de edema (65.0 cc vs 60.7 cc) y mayor volumen de necrosis (11.1 cc vs 10.9 cc). Además, el grupo de baja expresión de RA mostró menor ratio necrosis/realce (0.39 vs 0.40), menor ratio realce/edema (0.50 vs 0.57) y menor ratio necrosis/edema (0.18 vs 0.24). Sin embargo, ninguna de estas diferencias alcanzó la significación estadística ( $p > 0.05$ ). Además, el grupo de baja expresión del RA mostró una mediana de supervivencia menor en comparación con el grupo de alta expresión (16.17 vs 17.43 meses), aunque no alcanzó la significación estadística (**Figura 3**). No se identificaron otras diferencias entre estos dos grupos de expresión de RA (**Tabla 3**, véase en página 19).



**Figura 3.** Curvas de Kaplan-Meier comparando la supervivencia global en pacientes con alta y baja expresión de receptor de andrógenos a nivel de proteína.

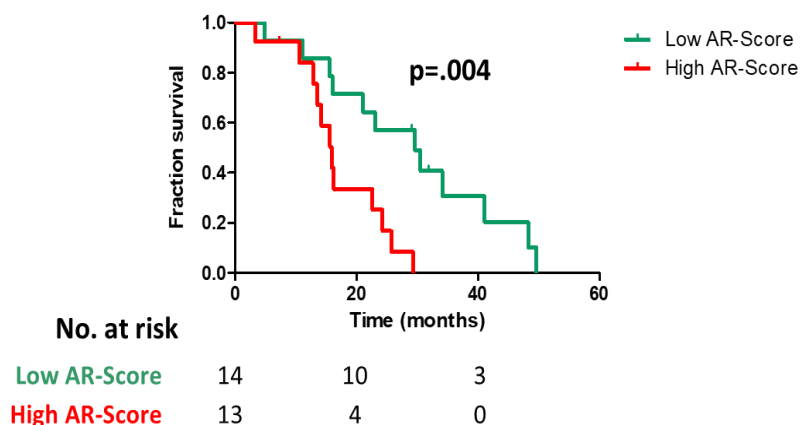
**Tabla 3. Análisis comparativo de las características clínicas, moleculares y de Imagen de RM de los pacientes con relación a baja expresión de RA ( $\leq p50$ ) y alta expresión del RA ( $> p50$ ).**

Variable		Baja expresión RA (proteína) N=24	Alta expresión RA (proteína) N=23	p-valor
Edad		54.5 (14.6)	56.6 (14.27)	0.489
Sexo (Hombre: Mujer)		11:13	14:9	0.385
Escala de rendimiento de Karnofsky < 80 (n=45)		8 (34.8%)	6 (27.3%)	0.749
Metilación del promotor MGMT (n=41)		14 (66.7%)	9 (45.0%)	0.215
AR-Score (n=27)		0.51 (DE=6.37)	6.37 (DE=7.54)	0.435
Fracción del genoma alterada (n=45)		0.26 (DE=0.18)	0.17 (DE=0.09)	0.291
Grado/Score de aneuploidía (n=44)		14.09 (DE=23.42)	12.18 (DE=17.30)	1.000
Recuento de mutaciones (n=47)		67.96 (DE=101.95)	44.09 (DE=22.06)	0.291
Tratamiento adyuvante	No	6 (25.0%)	4 (17.4%)	0.724
	RT+TMZ	18 (75.0%)	19 (82.6%)	
Tratamiento con Bevacizumab	No	18 (75.0%)	17 (73.9%)	1.000
	si	6 (25.0%)	6 (26.1%)	
Volumen de realce tumoral (cc)		27.3 (DE=18.60)	26.5 (DE=19.84)	0.537
Volumen de edema (cc)		65.0 (DE=25.02)	60.7 (DE=36.82)	0.407
Volumen de necrosis (cc)		11.1 (DE=10.14)	10.9 (DE=12.89)	0.625
Ratio Necrosis / Realce tumoral		0.39 (DE=0.31)	0.40 (DE=0.35)	0.815
Ratio Realce tumoral / Edema		0.50 (DE=0.37)	0.57 (DE=0.45)	1.000
Ratio Necrosis/Edema		0.18 (DE=0.14)	0.24 (DE=0.30)	0.831
Supervivencia global (SG) (meses [95% I.C.])		16.17 [12.81 – 19.53]	17.43 [13.04 – 19.29]	0.223
<b>Test estadísticos</b>		<b>Abreviaturas</b>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>- U de Mann Whitney</li> <li>- Prueba exacta de Fisher</li> <li>- Chi Cuadrado</li> <li>- Prueba de Mantel – Cox</li> </ul>		RM: Resonancia magnética RA: Receptor de andrógenos MGMT: O6Metilguanina-DNA metil-transferasa RT: Radioterapia CC: Centímetros cúbicos DE: Desviación estándar TMZ: Temozolamida I.C: Intervalo de confianza		

### 6.3. Comparación entre pacientes con baja y alta actividad del receptor de andrógenos

Tal y como se especifica en material y métodos, se utilizó la expresión de mRNA de 13 genes de respuesta a andrógenos (ARGs) previamente validados en tejido prostático (normal y tumoral) para crear un índice que reflejara la actividad del RA (denominado AR-score). Los datos de actividad de RA (AR-score) se obtuvieron de 27 pacientes, debido a que eran los únicos de los que se disponía de datos de RNAseq, ellos mostraron una actividad media del receptor de  $-0.28$  ( $SD=6.84$ ) en las muestras de GB. Se realizó un análisis comparativo entre pacientes con una baja ( $\leq p50$ ) y una alta ( $> p50$ ) actividad de RA, empleando la mediana ( $p50 = -0.46$ ) como punto de corte.

Los pacientes del grupo de alta actividad del RA ( $AR-score \geq p50$ ) eran significativamente mayores que los pacientes con baja actividad de RA (63.23 vs. 44.29 años;  $p=0.003$ ). Además, probablemente en consonancia con lo anterior, la situación funcional en el momento del diagnóstico de los pacientes con alta actividad del RA era significativamente peor que en el grupo de baja actividad ( $p=0.017$ ). En relación con la supervivencia global, los pacientes con AR-score alto presentaban un pronóstico peor que aquellos con AR-score bajo (15.87 meses vs 29.63 meses;  $p=0.004$ ) (**Figura 4**). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las variables de interés volumen de realce tumoral, volumen de edema, volumen de necrosis, ratio necrosis/realce, ratio realce/edema y ratio necrosis/edema (**Tabla 4**, véase en la página 21).



**Figura 4.** Curvas de Kaplan-Meier comparando la supervivencia global en pacientes con alta y baja actividad del receptor de andrógenos (AR-score).

**Tabla 4. Análisis comparativo de las características clínicas, moleculares y de Imagen de RM de los pacientes con relación a bajo AR-score ( $\leq p50$ ) y alto AR-score ( $> p50$ ).**

Variable		Baja AR-score N=14	Alto AR-score N=13	p-valor
Edad		44.29 (16.47)	63.23 (9.72)	0.003
Sexo (Hombre: Mujer)		9:5 (64.3% vs 35.7%)	8:5 (61.5% vs 38.5%)	1.000
Escala de rendimiento de Karnofsky < 80 (n=45)		2 (14.3%)	7 (63.6%)	0.017
Metilación del promotor MGMT (n=41)		9 (69.2%)	5 (62.5%)	1.000
Expresión RA (RPPA)		0.0245 (DE=0.4356)	-0.0503 (DE=0.374)	0.616
Fracción del genoma alterada (n=45)		0.19 (DE=0.10)	0.26 (DE=0.18)	0.325
Grado/Score de aneuploidía (n=44)		10.29 (DE=16.24)	23.25 (DE=33.48)	0.067
Recuento de mutaciones (n=47)		69.00 (DE=134.70)	53.15 (DE=33.12)	0.239
Tratamiento adyuvante	No	1 (7.1%)	6 (46.2%)	0.033
	RT+TMZ	13 (92.9%)	7 (53.8%)	
Tratamiento con Bevacizumab	No	11 (78.6%)	10 (76.9%)	1.000
	si	3 (21.4%)	3 (23.1%)	
Volumen de realce tumoral (cc)		25.75 (DE=16.91)	19.46 (DE=14.13)	0.280
Volumen de edema (cc)		56.49 (DE=29.57)	53.91 (DE=37.65)	0.720
Volumen de necrosis (cc)		14.47 (DE=12.98)	5.13 (DE=3.34)	0.105
Ratio Necrosis / Realce tumoral		0.54 (DE=0.47)	0.30 (DE=0.16)	0.280
Ratio Realce tumoral / Edema		0.54 (DE=0.44)	0.56 (DE=0.53)	0.650
Ratio Necrosis/Edema		0.32 (DE=0.34)	0.14 (DE=0.12)	0.325
Supervivencia global (SG) (meses [95% I.C.])		29.63 [17.47 – 41.79]	15.87 [13.86 – 31.34]	0.004
Test estadísticos		Abreviaturas		
<ul style="list-style-type: none"> <li>- U de Mann Whitney</li> <li>- Prueba exacta de Fisher</li> <li>- Chi Cuadrado</li> <li>- Prueba de Mantel – Cox</li> </ul>		RM: Resonancia Magnética RA: Receptor de andrógenos MGMT: O6Metilguanina-DNA metil-transferasa RT: Radioterapia CC: Centímetros cúbicos DE: Desviación estándar TMZ: Temozolamida I.C: Intervalo de confianza		

#### 6.4. Evaluación pronóstica de la expresión de RA y AR-score (Análisis de supervivencia)

Para analizar el valor pronóstico de cada una de las variables de interés, se realizó, en primer lugar, un análisis de regresión univariado. En dicho análisis, se observó como el AR-score se asoció con un peor pronóstico en relación con la supervivencia global (HR=1.073, 95% C.I. [1.013 - 1.137]; p= 0.016) así como la edad también se asoció a un peor pronóstico (HR=1.039, 95% C.I. [1.011 - 1.068]; p= 0.006). No se encontró una relación estadísticamente significativa en relación con la expresión de RA. Asimismo, se observó, en relación con las variables de segmentación, un peor pronóstico con relación al volumen de edema (HR=1.013, 95% C.I. [1.003 - 1.024]; p= 0.013), mientras que la ratio necrosis/edema se asoció a un mejor pronóstico (HR=0.214, 95% C.I. [0.048 - 0.942]; p= 0.041). Posteriormente, se realizó un análisis multivariado donde se incluyeron las variables que mostraron significación en el análisis de regresión de Cox univariado (p<0.05). Se relaciona significativamente a un peor pronóstico el AR-score (HR=1.097, 95% C.I. [1.001 - 1.203]; p= 0.048) y el volumen de edema (HR=1.020, 95% C.I. [1.002 - 1.39]; p= 0.029) (**Tabla 5**, continuación en la página 23).

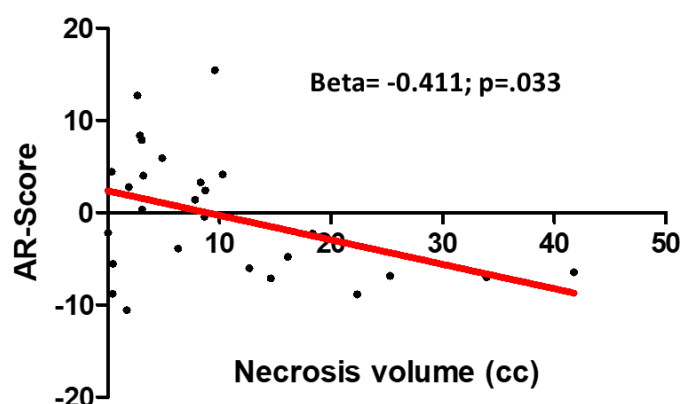
**Tabla 5. Análisis de regresión univariado y multivariado.**

Regresión de Cox Univariado			
Variable	Hazard Ratio	95,0% I.C	p-valor
Edad	1.039	1.011 - 1.068	0.006
Sexo:			
Hombre	1.330	0.704 – 2515	0.380
Mujer	0.752	0.398 – 1421	0.380
Escala de rendimiento de Karnofsky < 80	0.639	0.321 – 1.271	0.202
Metilación del promotor MGMT	0.660	0.329 – 1.324	0.242
Expresión de RA (RPPA)	0.687	0.317 – 1.487	0.340
AR-Score	1.073	1.013 – 1.137	0.016
Tratamiento adyuvante (RT+TMZ)	0.664	0.312 – 1.416	0.290
Tratamiento con Bevacizumab	1.215	0.569 – 2.596	0.615
Volumen de realce tumoral	1.005	0.988 – 1.023	0.537
Volumen de edema	1.013	1.003 – 1.024	0.013
Volumen de necrosis	0.989	0.962 – 1.016	0.426
Ratio Necrosis / Realce tumoral	0.537	0.203 – 1.424	0.211
Ratio Realce tumoral/ Edema	0.520	0.232 – 1.170	0.114
Ratio Necrosis / Edema	0.214	0.048 – 0.942	0.041

Regresión de Cox Multivariado			
Variable	Hazard Ratio	95,0% I.C	p-valor
Edad	1.022	0.982 – 1.063	0.292
AR-Score	1.097	1.001 – 1.203	0.048
Volumen de Edema	1.020	1.002 – 1.039	0.029
Ratio Necrosis / Edema	0.110	0.007 – 1.786	0.121
Abreviaturas			
RA: Receptor de andrógenos			
MGMT: O6Metilguanina-DNA metil-transferasa			
RT: Radioterapia			
TMZ: Temozolamida			
I.C: Intervalo de confianza			

### 6.5. Relación entre las variables volumétricas y AR-score

Para analizar la relación entre las diferentes variables volumétricas del tumor obtenidas de la segmentación de las imágenes de RM y la actividad del receptor de andrógenos (AR-score) se llevó a cabo un análisis de regresión lineal (**Tabla 6**). La única asociación con el AR-score que muestra significación estadística es con el volumen de necrosis, siendo esta una asociación negativa y de intensidad moderada ( $\beta = -0.411$ ;  $p = 0.033$ ) (**Figura 5**) (**Tabla 6**, véase en la página 24). El resto de las variables volumétricas no mostró asociación con el AR-score.



**Figura 5.** Relación entre el volumen de necrosis y la actividad del receptor de andrógenos (AR-score).

**Tabla 6. Análisis de regresión lineal entre la actividad del receptor de andrógenos (AR-score) y las variables volumétricas obtenidas de la segmentación del tumor.**

	<b>Beta</b>	<b>Error Estándar</b>	<b>p-valor</b>
Volumen de realce tumoral	-0.073	0.46	0.716
Volumen de edema	-0.157	0.96	0.433
Volumen de necrosis	-0.411	0.28	0.033
Ratio necrosis / Realce tumoral	-0.307	0.01	0.119
Ratio realce tumoral / Edema	0.139	0.01	0.488
Ratio necrosis / Edema	-0.269	0.01	0.175

## 7. DISCUSIÓN

El objetivo principal del presente estudio era el de analizar y describir la relación entre la expresión y la actividad del RA en el GB y las características de imagen en RM, así como analizar la relación entre la expresión y la actividad del RA y los diferentes volúmenes tumorales (captación de contraste -realce tumoral-, necrosis, edema) y determinar su valor pronóstico, en términos de supervivencia global. Para ello, se llevó a cabo un análisis comparativo entre pacientes con baja y alta expresión de RA y otro de baja y alta actividad del RA (determinada a partir del AR-score) en el que se integraron las variables volumétricas combinadas con otras variables clínicas y moleculares. Se evidenció una relación negativa entre el pronóstico y la actividad del RA y el volumen de edema de forma independiente. Además, se observó la presencia de una relación negativa entre la actividad del RA y el volumen de necrosis tumoral. Estos hallazgos serán discutidos a continuación.

En la literatura, varios autores han abordado previamente la relación entre la expresión de RA y el GB. Yu X et al. (2015) realizó un estudio de comparación entre tejido sano cerebral y de GB en el mismo paciente, en el que mostraron una significativa mayor expresión del RA por parte del GB, sugiriendo que la señalización de RA puede desempeñar un papel en el crecimiento de GB (18). Asimismo, también otros autores contemplan que a medida que avanza el grado de malignidad de los astrocitomas, la expresión de RA aumenta, siendo el nivel de expresión más alto en el GB (23, 32).

Sin embargo, la expresión del RA por sí mismo no tiene por qué asociarse con un peor pronóstico. De hecho, en el presente estudio, la expresión del RA no se asoció con el pronóstico de estos pacientes, no así su actividad. En efecto, se ha observado una menor supervivencia global en aquellos pacientes que presentaban un alto AR-score.



Estos resultados están en la línea de algunos trabajos en los que se ha analizado el efecto de los andrógenos sobre cultivos de líneas celulares de GB. Estos estudios *in vitro* muestran como los andrógenos a través de RA promueven la proliferación, migración e invasión de células derivadas de GB (32). Además, en un estudio realizado por Zalcman et al. (2018), en el que emplearon una muestra de 703 pacientes con GB obtenidos de la base de datos TCGA, se destacó la correlación negativa significativa de la expresión de RA con la puntuación en la escala de Karnofsky, lo que podía sugerir la existencia de una relación entre la expresión de RA y la agresividad del tumor. Sin embargo, no hallaron correlación entre la expresión de RA y la supervivencia (22). En comparación con este estudio, cabe destacar que en nuestra muestra tampoco se obtuvo relación estadísticamente significativa entre la expresión de RA y la supervivencia, sin embargo, sí que se asoció a un peor pronóstico la actividad del RA determinada mediante el AR-score. Además, el AR-score se correlacionó negativamente con la puntuación en la escala de Karnofsky. Sin embargo, el peor pronóstico que hemos encontrado en los pacientes con alto AR-score podría asociarse con la mayor edad de este grupo y la peor situación funcional que tenían en el momento del diagnóstico. No obstante, el análisis de regresión de Cox muestra al AR-score como un factor de mal pronóstico independiente (HR=1.097, 95% C.I. [1.001 - 1.203]; p= 0.048). Por lo tanto, en este reducido grupo de pacientes, parece que ni la edad ni la situación funcional fueron las variables que se relacionaban de forma más estrecha con el pronóstico.

Por lo tanto, coincidimos con el resto de autores en la probable importancia del RA en el GB, sin embargo, nuestros datos sugieren que, en términos de pronóstico, lo más importante no es la expresión de RA, sino su actividad (AR-score).

En cuanto la asociación del mayor volumen de edema con un peor pronóstico, este resultado podría explicarse porque se ha comprobado que los tumores de alto grado presentan niveles elevados de expresión de citoquinas pro angiogénicas como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), lo que genera una proliferación vascular patológica, con neovasos de características diferentes de los vasos normales, habitualmente de mayor diámetro y permeabilidad alterada, que determinan la formación de edema vasogénico (14). Este edema, como se comentó en la introducción al trabajo, puede observarse mediante RM apareciendo hiperintenso en las secuencias T2-FLAIR, donde se ha comprobado infiltración tumoral microscópica (15), lo que podría explicar el peor pronóstico observado.

Por otro lado, en el análisis de regresión lineal, se pudo observar que a medida que la actividad del RA aumenta, disminuye el volumen de necrosis. Curiosamente, estudios recientes encontraron que el RA podría desempeñar funciones diversas en la señalización de muerte celular, además de en su proliferación. Se contempla que el RA podría también modular esta señalización de muerte celular para controlar la progresión en el cáncer de próstata, así como inhibir la necrosis (33). La asociación entre actividad del RA y el desarrollo de necrosis es conocida desde hace varios decenios. En 1979, un estudio realizado por Monus et al. reportó que los andrógenos podrían proteger las células corticales renales de la necrosis programada inducida por la administración de vasopresina (34). La necrosis programada se trata de un término sugerido por la NCCD (*Nomenclature Committee on cell Death*) para referirse a la necroptosis, fenómeno que hace referencia a la necrosis que ocurre de manera regulada. Así se ha informado que la necrosis programada es inducida por varios estímulos, como mencionamos con la vasopresina (33). En esta línea, Monus et al. (1979) observó como el uso del antiandrógeno Acetato de Ciproterona, con su inhibición de la unión de andrógenos al RA, aumentó la necrosis programada. Esto es sugestivo de que la señalización andrógenos/RA podría desempeñar un papel negativo en la necrosis programada (33).

Igualmente, una revisión por Eisermann y Fraizer (2017) expone los mecanismos de angiogénesis mediados por el RA a través del VEGF (mediante translocación nuclear) en cáncer de próstata. Tal es así, que el VEGF se regula mediante la formación del complejo RA con Sp1 en la región promotora central de las células de cáncer de próstata (35). Con ello, en base a nuestros resultados, donde una mayor activación del RA se relaciona a menor necrosis tumoral, se sugiere la idea de que también suceda tal mecanismo en GB. De forma que la angiogénesis mediada por VEGF a través del RA pudiera explicar la disminución de necrosis tumoral. Además, hay que destacar que el VEGF subtipo A constituye un gen de respuesta a andrógenos, es decir, su actividad está inducida por la activación del RA, hecho que ayuda a entender mejor aún estos resultados (35).

Sin embargo, la presencia de un peor pronóstico en pacientes con mayor actividad de RA podría deberse únicamente a la diferencia de edad entre grupos. Efectivamente, en nuestro trabajo, aquellos pacientes con mayor edad presentaban mayor AR-score. El hecho de que en el análisis multivariable el AR-score se comporte como un factor independiente resuelve en parte esta cuestión, pero se plantean otras importantes. Basándonos en la presunción de que cabría esperar una menor activación del RA en pacientes de mayor edad a consecuencia de

unos niveles de concentración de hormonas esteroideas inferiores (36), podríamos hipotetizar con que la activación del RA no sea únicamente dependiente de los niveles circulantes de andrógenos, sino que pueda deberse a los que se producen localmente a través del proceso de esteroidogénesis intratumoral. Como comentamos anteriormente, la producción de neuroesteroides mediada por el SNC supone un papel protector en el mantenimiento de la salud del cerebro, protegiendo las células cerebrales contra el estrés (oxidativo/citotoxicidad). Por otro lado, las células de GB también sintetizan y secretan hormonas esteroideas como la DHEA a partir del colesterol (37). Se trata de un tipo de neuroesteroide que protege las células de glioma de la apoptosis inducida por quimioterapia, lo que conduce a la resistencia a los fármacos. En el estudio realizado por Armandari et. al (2014), utilizaron la Abiraterona, fármaco quimioterapéutico inhibidor de la enzima CYP17A1 aprobado para el tratamiento del cáncer de próstata resistente a la terapia por privación de andrógenos (ADT), CRPC (*Castrate-resistant prostate cancer* en inglés) donde observaron que exhibe un potente efecto supresor sobre los GB in vitro e in vivo (37). Otros estudios como el de Lin H-Y et al. (2019), también subrayan que una estrategia dirigida a la esteroidogénesis, como la inhibición de CYP17A1, es una opción potencial para el tratamiento del GB (19).

Estas ideas expuestas concuerdan con observaciones realizadas en referencia al cáncer de próstata, donde también se ha informado de la expresión de CYP17A1, lo que implica potencialmente la síntesis de andrógenos de *novo* a partir del colesterol en el propio tumor, suponiendo mecanismos de resistencia que podrían explicar el sorprendente hallazgo de elevadas concentraciones intratumorales de T y DHT a niveles fisiológicamente significativos a pesar de ADT en algunos pacientes (38). Así pues, la evidencia acumulada ha demostrado que los niveles de andrógenos intraprostáticos después de la ADT son suficientes para inducir la progresión del cáncer, justificándose una posible regulación positiva de ARN y enzimas de esteroidogénesis como un mecanismo compensatorio para el bajo nivel de testosterona debido a ADT (39). En este sentido, esta situación podría darse igualmente en pacientes con GB.

Tras lo expuesto en la literatura y los resultados obtenidos en nuestro estudio, nos lleva a plantearnos la similitud que podría existir entre el GB y tumores cuyo desarrollo y progresión depende de la estimulación androgénica y sus líneas terapéuticas están enfocadas en la modulación del receptor de andrógenos, tales como el cáncer de próstata o mama. Ya sea a través del bloqueo o privación de andrógenos por fármacos, como en el cáncer de próstata (40), o a través de tratamientos dirigidos a los receptores de andrógenos como en el cáncer de mama

(41 , 42). El conocimiento existente hasta la fecha en este campo refuerza la idea de proponer la modulación del RA como una posible opción terapéutica en el GB.

Este trabajo cuenta con una serie de limitaciones que deben ser señaladas. En primer lugar, se trata de un estudio con una muestra limitada, lo que puede implicar una falta de potencia estadística para identificar posibles relaciones entre la expresión y actividad del RA con el resto de los volúmenes determinados en resonancia. Sin embargo, los hallazgos de este trabajo en el contexto de esta enfermedad podrían resultar lo suficientemente interesantes como para seguir profundizando en su estudio, incluyendo un número mayor de sujetos. En segundo lugar, y relacionado con la limitación indicada previamente, muchos de los estudios de resonancia que hubo que excluir no contaban con los requisitos para poder ser incluidos en la plataforma en línea OncoHabitats (estudios no realizados de forma estándar). Además, dicha plataforma mostró, en algunos casos, errores de segmentación. Estos hechos hacen necesario el uso y comparación de OncoHabitats con otras herramientas de segmentación para determinar cuál de ellas es más robusta y pueda emplearse en estudios de este tipo. Por último, la determinación de la actividad del RA se ha hecho considerando genes de respuesta a andrógenos específicos de células prostáticas o de cáncer de próstata. No existen estudios que hayan analizado de forma específica cuáles son los genes de respuesta a andrógenos en GB. Esta es una cuestión que deberá dilucidarse en futuros trabajos.

## **8. CONCLUSIÓN**

La actividad del RA, y no su expresión, se asocia con la presencia de peor pronóstico vital en pacientes diagnosticados de GB. Además, esta actividad parece guardar una relación lineal con el volumen de necrosis visualizado en los estudios de resonancia magnética prequirúrgicos. Futuros estudios podrán confirmar la posibilidad de emplear fármacos para la modulación de la actividad del RA, tal y como ocurre en el cáncer de mama o de próstata, en el tratamiento del GB.

De esta manera, este estudio contribuye a la evidencia sugiriendo que el RA constituye una posible diana terapéutica para el GB, donde su modulación podría constituir una línea de tratamiento al igual que en otros tumores como el de próstata o mama.

## 9. ¿QUÉ HEMOS APRENDIDO?

La experiencia de hacer un trabajo de esta naturaleza y magnitud con otra persona requiere reunir cualidades que sólo se aprenden a través de la práctica. A pesar de las dificultades que acarrea la actual situación pandémica por la Covid-19, aprender a trabajar en equipo resultó una tarea vital. Hemos tomado cada vivencia e inconveniente como el necesario aprendizaje que supone realizar un estudio.

Dentro de las habilidades que hemos ido absorbiendo durante su elaboración, ya sea por el propio tema, la búsqueda bibliográfica ha sido uno de los pilares en nuestro estudio. Un estricto perfeccionamiento en nuestras técnicas de búsqueda ha supuesto una necesidad, aprendiendo a discernir qué información es relevante y cuál no, a comprender e interpretar críticamente artículos científicos. Aún si en el plazo de nuestra formación hemos requerido herramientas de búsqueda bibliográfica es ahora cuando sentimos que tras su reiterado uso somos capaces de recabar, contrastar y citar información de calidad.

Otro aspecto, es que fue necesario seleccionar las secuencias potenciadas en T1, T2 y FLAIR de cada uno de nuestros pacientes. Esto ha supuesto adentrarnos de lleno en la comprensión visual de las estructuras cerebrales y sus lesiones a través de RM, así como identificar correctamente dichas secuencias. Es algo que sin duda supondrá un inequívoco beneficio en nuestro futuro profesional, a lo que se le suma la capacidad de interpretar resultados estadísticos.

Todo ello engloba destrezas que el día de mañana nos potenciarán como futuras investigadoras, algo que hemos experimentado al ser parte de un equipo más grande.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Oberheim Bush NA, Hervey-Jumper SL, Berger MS. Management of Glioblastoma, Present and Future. *World Neurosurg.* 2019;131:328-38.
2. Rhun E Le, Preusser M, Roth P, Reardon DA, Bent M Van Den, Wen P, et al. Molecular targeted therapy of glioblastoma. *Cancer Treat Rev.* 2019;80(August):101896.
3. Wirsching HG, Galanis E, Weller M. Glioblastoma. *Handb Clin Neurol.* 2016;134:381-97.
4. Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS. Neural Stem Cells and the Origin of Gliomas. *N Engl J Med.* 2005;353(8):811-22.
5. VleeSchouwer S De. Glioblastoma. Codon Publications Brisbane. 2017. 427 p.
6. Ohgaki H, Kleihues P. The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma International Agency for Research on Cancer. 2012;
7. Aldape K, Zadeh G, Mansouri S, Reifenberger G, von Deimling A. Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol.* 2015;129(6):829-48.
8. Wang J, Su HK, Zhao HF, Chen ZP, To SST. Progress in the application of molecular biomarkers in gliomas. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;465(1):1-4.
9. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, Deimling A Von, Figarella D, Webster B, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System : a summary. 2016;803-20.
10. Raizer J, Parsa A. Current Understanding and Treatment of Gliomas. *Cancer Treat Res.* 2015;163:1-14.
11. Huttner A. Overview of Primary Brain Tumors Pathologic Classification , Epidemiology , Molecular Neuroepithelial tumors WHO classification Pathology Genetics. *Hematol Oncol Clin N.* 2012;26:715-32.
12. Gately L, McLachlan S, Dowling A, Philip J. Life beyond a diagnosis of glioblastoma: a systematic review of the literature. *J Cancer Surviv.* 2017;11(4):447-52.
13. Davis ME. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment Mary. *Clin J Oncol Nurs.* 2016;20(5):1-14.
14. Okuma C. FR. Evaluation of Gliomas for advanced Magnetic Resonance Imaging. 2017;28(3):360-77.
15. Shukla G, Alexander GS, Bakas S, Nikam R, Talekar K, Joshua D, et al. Advanced magnetic resonance imaging in glioblastoma: a review. *Chinese Clin Oncol.* 2017;6(4):1-12.

16. Liu C, Zhang Y, Zhang K, Bian C, Zhao Y, Zhang J. Expression of estrogen receptors, androgen receptor and steroid receptor coactivator-3 is negatively correlated to the differentiation of astrocytic tumors. *Cancer Epidemiol.* 2014;38(3):291-7.
17. Di Donato M, Bilancio A, Amato LD, Claudiani P, Antonietta M, Chernoff J. Cross-talk between androgen receptor / filamin A and TrkA regulates neurite outgrowth in. *Am Soc Cell Biol.* 2015;26(Androgen receptor and neuritogenesis):2858-72.
18. Yu X, Jiang Y, Wei W, Cong P, Ding Y, Xiang L, et al. Androgen receptor signaling regulates growth of glioblastoma multiforme in men. *Tumor Biol.* 2015;36(2):967-72.
19. Lin H-Y, Ko C-Y, Kao T-J, Yang W-B, Tsai Y-T, Chuang J-Y et al. CYP17A1 Maintains the Survival of Glioblastomas by. *Cancers (Basel).* 2019;11(1378):1-14.
20. Bello-alvarez C, Camacho-arroyo I. Impact of sex in the prevalence and progression of glioblastomas : the role of gonadal steroid hormones. *Biol Sex Differ.* 2021;12(28):1-13.
21. Tan MHE, Li J, Xu HE, Melcher K, Yong E. Androgen receptor : structure , role in prostate cancer and drug discovery. *Nat Publ Gr.* 2014;36(1):3-23.
22. Zalcman N, Canello T, Ovadia H, Charbit H, Zelikovitch B, Mordechai A, et al. Androgen receptor: A potential therapeutic target for glioblastoma. *Oncotarget.* 2018;9(28):19980-93.
23. Bao D, Cheng C, Lan X, Xing R, Chen Z, Zhao H, et al. Regulation of p53 glioma cell proliferation by androgen receptor-mediated inhibition of small VCP / p97-interacting protein expression. *Oncotarget.* 2017;8(14):23142-54.
24. Rodríguez-Lozano DC, Velázquez-Vázquez DE, Moral-morales A, Camacho-arroyo I. Dihydrotestosterone Induces Proliferation , Migration , and Invasion of Human Glioblastoma. *Onco Targets Ther.* 2020;13:8813-23.
25. Juan-albarracín J, Fuster-garcia E, Manjón J V. Automated Glioblastoma Segmentation Based on a Multiparametric Structured Unsupervised Classification. *PLoS One.* 2015;10(5)(: e0125143):1-20.
26. Bataller FB. Desarrollo de un estudio clínico observacional multicéntrico retrospectivo para validar la tecnología de análisis de imagen médica OncoHabitats. Trabajo de Fin de Máster en Ingeniería Biomédica. Unisidad Politécnica de Valencia; 2018.
27. Bady P, Sciuscio D, Diserens AC, Bloch J, Van Den Bent MJ, Marosi C et al. MGMT methylation analysis of glioblastoma on the Infinium methylation BeadChip identifies two distinct CpG regions associated with gene silencing and outcome , yielding a prediction model for comparisons across datasets , tumor grades , and CIMP-status. *Acta*

- Neuropathol. 124(4):547-60.
28. Plata-Bello J, Fariña-Jerónimo H, Betancor I, Salido E. High Expression of FOXP2 Is Associated with Worse Prognosis in Glioblastoma. *World Neurosurg.* :1-26.
  29. Eric C. Bolton, Alex Y. So, Christina Chaivorapol, Christopher M. Haqq HL and KRY. Cell- and gene-specific regulation of primary target genes by the androgen receptor Cell- and gene-specific regulation of primary target genes by the androgen receptor. *Genes Dev.* 21(16):2005-17.
  30. Acosta-Lopez S, Diaz-Bethencourt D, Concepción-Massip T, Martin-Fernandez de Basoa MC, Plata-Bello A, Gonzalez-Rodriguez A, et al. The androgen receptor expression and its activity have different relationships with prognosis in hepatocellular carcinoma. *Sci Rep.* 2020;10(1):1-11.
  31. Falcón Wehbe JJ, China Torres MA. Papel pronóstico del receptor de andrógenos en el glioblastoma. Universidad de La Laguna; 2020.
  32. Rodríguez-Lozano DC, Piña-Medina AG, Hansberg-Pastor V, Bello-Alvarez C, Camacho-Arroyo I. Testosterone promotes glioblastoma cell proliferation, migration, and invasion through androgen receptor activation. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10(February):1-9.
  33. Simeng Wen, Yuanjie Niu, Soo Ok Lee and CC. Androgen Receptor (AR) Positive vs Negative Roles in Prostate Cancer Cell Deaths including Apoptosis, Anoikis, Entosis, Necrosis and Autophagic Cell Death. *Cancer Treat Rev.* 2014;40(1):1-22.
  34. Monus Z, Laszlo FA. Cyproterone acetate-promoted prevention of renal cortical necrosis following testosterone + vasopressin administration. *Br J Exp Pathol.* 1979;60(1):72-5.
  35. Eisermann K, Fraizer G. The androgen receptor and VEGF: Mechanisms of androgen-regulated angiogenesis in prostate cancer. *Cancers (Basel).* 2017;9(4):1-10.
  36. Kaufman JM, Vermeulen A. The decline of androgen levels in elderly men and its clinical and therapeutic implications. *Endocr Rev.* 2005;26(6):833-76.
  37. Armandari I, Hamid AR, Verhaegh G, Schalken J. Intratumoral steroidogenesis in castration-resistant prostate cancer : a target for therapy. *Prostate Int.* 2014;2(3):105-13.
  38. Auchus RJ, Sharifi N. Sex Hormones and Prostate Cancer. *Annu Rev Med.* 71(17.1):33-45.
  39. Hamid ARAH, Putra HWK, Sari NP, Diana P, Sesari SS, Novita E, et al. Early upregulation of AR and steroidogenesis enzyme expression after 3 months of androgen-deprivation therapy. *BMC Urol.* 2020;20(71):1-10.



40. Carroll, Rona S., Ph.D.; Zhang, Jianping, M.S.; Dashner, Kathleen, B.A.; Sar, Madhabananda, Ph.D.; Black, Peter McL., M.D. PD. Steroid Hormone Receptors in Astrocytic Neoplasms. Experimental Study. Neurosurgery. 1995;37(3).
41. Quiles MP. Valor Pronóstico y Predictivo de los Receptores de Andrógenos en el Cáncer de Mama. Universidad de Murcia; 2018.
42. Kono, M., Fujii, T., Lim, B., Karuturi, M. S., Tripathy, D., & Ueno NT. Androgen Receptor Function and Androgen Receptor–Targeted Therapies in Breast Cancer A Review. JAMA Oncol. 2017;3(9):1266-73.

**Imagen de portada extraída de plataforma en línea de diseño gráfico *Canva* (<https://www.canva.com/>)**

