



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO
**PAPEL DEL ANTÍGENO KI-67 Y LA PROTEÍNA
P53 COMO MARCADORES DE TUMORES DEL
SISTEMA NERVIOSO CENTRAL**

Autor: Esther Martín De Benito

Fecha: 25/05/2020

Tutor: Dr. Ernesto Doncel Pérez

ÍNDICE

RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN.....	3
Ki-67	3
TP53	3
CONCEPTO DE INMUNOHISTOQUÍMICA	4
OBJETIVOS	4
MATERIAL Y MÉTODOS.....	4
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	5
CONCLUSIONES	18
BIBLIOGRAFÍA	18

Resumen

Los tumores cerebrales contribuyen de manera significativa a la morbimortalidad de todos los grupos de edad. En España¹ son la segunda forma más común de cancer en niños y la primera en USA².

Durante la última década, ha habido una creciente conciencia sobre la naturaleza heterogénea de los tumores cerebrales, pues tumores con el mismo diagnóstico histológico, tienen un genotipo y un potencial maligno distinto. Por esta razón, la Clasificación de los tumores del sistema nervioso central de la OMS se revisó en 2016³ para incorporar biomarcadores moleculares, junto con las características histológicas clásicas, en un sistema integrado de diagnóstico.

En este trabajo se llevó a cabo una revisión bibliográfica sobre el papel de dos de los marcadores incluidos en la nueva clasificación de 2016, el antígeno ki-67 y la proteína p53, ambos toman parte en el desarrollo del ciclo celular y, por tanto, son reflejo del estado de muchos tipos de tumores. Tras la revisión llevada a cabo se ha concluido el desempeño mayoritario de estos marcadores con fin diagnóstico, pronóstico y predictivo en gran parte de los tumores del SNC, promoviendo su utilización en la práctica rutinaria. Se alenta, finalmente, a incorporar nuevos estudios en los que se obtengan perfiles genéticos de los marcadores para poder correlacionar con mayor exactitud sus variantes y su aparición en neoplasias, y no exclusivamente su presencia. También se insta a posibles combinaciones de estos con otras moléculas estudiadas que promuevan, en combinación, diagnósticos más precisos y terapias dirigidas más eficaces.

Abstract

Brain tumors significantly affected morbidity and mortality in all age groups. they are the second most common form of cancer in children In Spain¹ and the first in the USA².

During the last decade, there has been an increasing aware of the brain tumors' heterogeneous nature, since tumors with the same histological diagnosis can have different genotype and malignant potential. Therefore, the WHO Classification of Central Nervous System Tumors was revised in 2016³ to incorporate molecular biomarkers, along with classical histological features, into an integrated diagnostic system.

In this work it was made a bibliographic review about the role of two of the markers included in the new 2016's classification, the ki-67 antigen and the p53 protein, both take part in the development of the cell cycle and, therefore, are a status' reflection of many tumors types. After the carried out review, the performance of these markers has been concluded mainly for diagnostic, prognostic and predictive purposes in most Central Nervous System tumors, promoting their use in routinal practice. Finally, it is encouraged to incorporate new studies that obtain genetic profiles of the markers to be able to correlate their variants and their appearance in neoplasms with greater precision, and not exclusively their presence. Possible combinations of these with other studied molecules are also promoted with the aim of achieving more accurate diagnoses and more targeted therapies.

Introducción

Los marcadores tumorales son sustancias secretadas bien por células cancerosas o bien por células sanas en respuesta al cancer. En su mayoría son de naturaleza proteica, y se encuentran aumentadas en caso de que exista un tumor⁴.

Los estudios de perfiles moleculares de todo el genoma han revelado alteraciones genéticas características y perfiles epigenéticos asociados con diferentes tipos de tumores del SNC. Estas características moleculares pueden ser utilizadas para refinar la clasificación de tumores del SNC, para mejorar la predicción de los resultados del paciente y para guiar individualmente el tratamiento, así como confirmar la utilidad o no de un tratamiento/fármaco en un tipo concreto de tumor⁵.

Ki-67

Se identificó por primera vez como un antígeno en los núcleos de las células de linfoma de Hodgkin (Gerdes et al. 1983)⁶ que se expresa altamente en las células en ciclo (en división), pero está fuertemente *down-regulated* en las células G0 en reposo (Gerdes et al. 1984). Esta característica ha convertido al Ki-67 en un marcador de proliferación clínicamente importante⁷. El índice de marcado ki-67 o *labeling index* (LI) mediante unión a un anticuerpo específico (normalmente MIB-1), se emplea ampliamente en la evaluación de la agresividad de los tumores cerebrales. Sin embargo, Ki-67 está sujeto a la variabilidad entre laboratorios⁸.

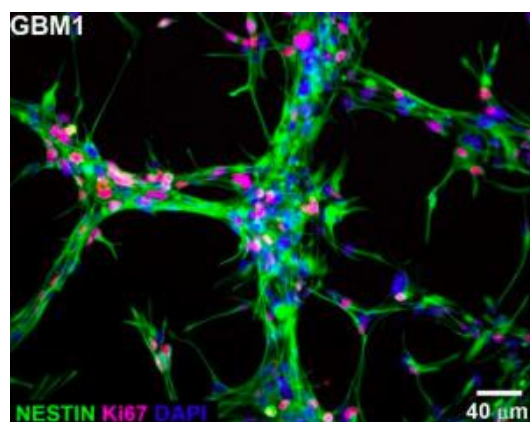
TP53

Actualmente, la proteína supresora de tumores p53 (también llamada TP53 en humanos) ha sido nombrada el "guardián del genoma"⁹. Esto se debe a que su inactivación allana el camino para la aparición de cánceres. Es una proteína de unión al ADN mediante un dominio específico, que detiene el ciclo celular ante el estrés genómico y esencialmente impide la

proliferación de las células con el material genético dañado, eliminando así futuras generaciones celulares anómalas¹⁰. La mayoría de las mutaciones en TP53 detectadas en las células cancerosas son mutaciones puntuales en el dominio de unión al ADN¹¹. Se cree que estas proteínas p53 mutantes pueden desencadenar efectos negativos dominantes, ganancia de función o pérdida de función¹².

Concepto de Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica (IHC) es la detección de antígenos en secciones de tejido mediante anticuerpos específicos. La ventaja de IHC sobre otros métodos de detección de proteínas es la capacidad de correlacionar la presencia de un antígeno con su ubicación en un tejido o célula¹³. Estas pruebas han reafirmado su uso como marcadores pronósticos y predictivos, como 'diagnóstico complementario', abriendo una ventana a la biología molecular de los tumores y, en algunos casos, facilitando terapias dirigidas efectivas¹⁴.



Hay diversas y múltiples técnicas, directas, indirectas (uso de anti-anticuerpo), inmunoenzimas y uso de fluorocromos (inmunofluorescencia) entre otros.

Figura 1. Imagen de inmunofluorescencia perteneciente a un modelo celular de Glioblastoma (GBM1), un tipo de tumor cerebral. Las células expresan el marcador de proliferación Ki-67 (rojo). La colocalización de Ki-67 en los núcleos fue visualizada con la sonda DAPI¹⁵ (azul).

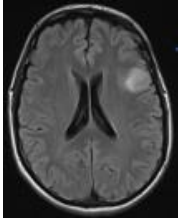
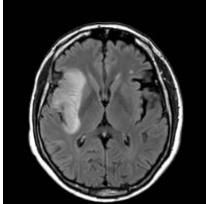
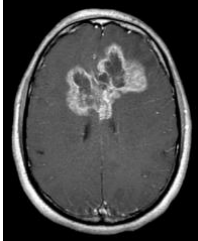

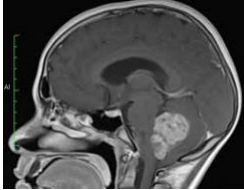
Objetivos

El objetivo de esta revisión es describir la función y el uso para el que han sido empleados los marcadores ki-67 y p53 en los distintos tipos de tumores del sistema nervioso central (SNC). Tanto para el diagnóstico de la entidad tumoral, como para la monitorización de la supervivencia y la respuesta a distintos tratamientos y, poder así, esclarecer pautas y recomendaciones para futuros estudios.

Material y métodos

Para la elaboración de esta revisión bibliográfica, han sido consultados alrededor de 80 publicaciones, siendo seleccionadas finalmente 49 referencias, publicadas en la última década y que están reflejadas en la bibliografía. Los buscadores empleados fueron PubMed, Scielo, Google Scholar y las páginas web de organismos como la AECC (Asociación Española Contra el Cáncer) o el NCI (National Cancer Institute, USA).

Las palabras clave de la búsqueda fueron: CNS, tumor, biomarker, inmunohistochemistry, ki-67, p53, tumor grade, diagnostic, prognostic, therapy.

TIPO DE TUMOR	CARACTERÍSTICAS	Uso ki67/p53
Glioma 	<ul style="list-style-type: none"> Tumor que surge de los tejidos de apoyo o “adhesivos” del cerebro, llamados células gliales. Hay tres tipos de células gliales que dan lugar a tumores; astrocitos, oligodendrocitos y células ependimales. 	<ul style="list-style-type: none"> Ambos ki-67 y p53 predictivos, pronósticos y diagnósticos
Astrocitoma 	<ul style="list-style-type: none"> Un tipo de glioma Es un tumor que se origina en células en forma de estrella llamadas astrocitos, que se encuentran en el cerebro. 	<ul style="list-style-type: none"> Ki-67 pronóstico Ambos diagnósticos: Ki-67 > p53
Glioblastoma (GBM) 	<p>GBM Primario:</p> <ul style="list-style-type: none"> Ocurre principalmente en la región cerebroespinal del cerebro Contribuye a aproximadamente el 16% de los casos de tumor cerebral primario. <p>GBM Multiforme:</p> <ul style="list-style-type: none"> Un tipo de astrocitoma de Grado IV (crecimiento rápido) Aparece en los lóbulos del cerebro (frontal y temporal) El GBM primario + GMB multiforme representan más de la mitad de la totalidad de gliomas 	<ul style="list-style-type: none"> p53 predictivo, pronóstico y diagnóstico ki-67 pronóstico indirecto
Oligodendroglioma 	<ul style="list-style-type: none"> Un tipo de glioma Surge de los oligodendrocitos 	<ul style="list-style-type: none"> Ki-67 y p53 (individualmente) diagnósticos Ki-67 en combinación con otros, pronóstico
Ependimoma 	<ul style="list-style-type: none"> Un tipo de glioma Surge de las células ependimarias (flageladas) Recubren los ventrículos del cerebro y la región central de la médula espinal 	<ul style="list-style-type: none"> Ki-67 y p53 diagnósticos y pronósticos Ki-67 > p53
Tumores embrionarios	<ul style="list-style-type: none"> Incluye tumores neuroectodermales primitivos y teratoide/rabdoide atípicos Todos son de alto grado (IV) 	<ul style="list-style-type: none"> Ki-67 y p53 uso pronóstico

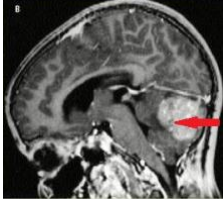
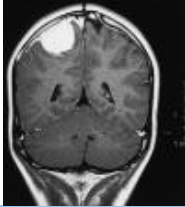

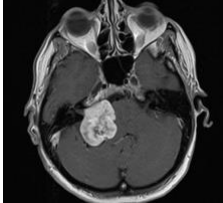
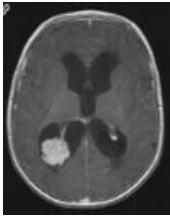
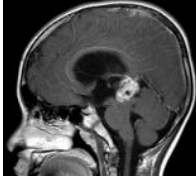
	<ul style="list-style-type: none"> • Meduloblastoma surge en el cerebelo y se expande a otras zonas del cerebro y la médula espinal 	
<p>Meningioma</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Es un tipo de tumor que surge de la aracnoides de las meninges. • Común, representa el 38% de los tumores cerebrales primarios. • Normalmente de grado bajo 	<ul style="list-style-type: none"> • Ki-67 y p53 diagnóstico y pronóstico
<p>Tumores región selar</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Incluye craneofaringioma, tumor que surge de pequeños nidos de células ubicados cerca del tallo hipofisario • Casi siempre de bajo grado 	<ul style="list-style-type: none"> • Ki-67 predictivo y pronóstico • p53 en combinación con otros, pronóstico
<p>Tumores de nervios</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Incluye Neuromas malignos de Grado IV (periféricos) • Schwannoma comienza en las células de Schwann, que recubren los nervios (suele ser de grado bajo) • Incluye también Neurofibroma y Perineurioma (grado bajo) 	<ul style="list-style-type: none"> • Ambos ki-67 y p53 uso pronóstico y diagnóstico
<p>Tumores Plexos Coroideos</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Tumores de estructuras vasculares del encéfalo (productoras de LCR) • Existen de bajo grado (papilomas) o de alto grado (carcinomas) 	<ul style="list-style-type: none"> • Ambos ki-67 y p53 uso predictivo, pronóstico y diagnóstico
<p>Tumores región pineal</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Tumor que surge en la glándula pineal o alrededor de esta • Comprende los pineocitomas, pineoblastomas y los germinomas pineales • De grado I a IV 	<ul style="list-style-type: none"> • Ki-67 uso diagnóstico y pronóstico • p53 pronóstico

Tabla 1. Para la estructuración de la revisión se utilizó como base la clasificación histológica más reciente llevada a cabo por la OMS de tumores del SNC en función del grado de malignidad³, acorde a los nuevos criterios moleculares de diagnóstico integrado y que responde a la columna “Tipo de tumor”.

La columna central describe las características más remarcables de cada tumor, su graduación y su pertenencia dentro de categorías mayores.

La graduación actual de la OMS para los tumores del SNC se basa principalmente en cuatro criterios morfológicos: atipia citológica, actividad mitótica, proliferación microvascular y necrosis.

Según los parámetros anteriores los tumores del SNC se clasifican en cuatro grados:

- Grado I: los tumores no cumplen ninguno de los criterios. Estos tumores son de crecimiento lento, no malignos y están asociados con la supervivencia a largo plazo.
- Grado II: los tumores cumplen solo un criterio, es decir, únicamente presentan atipia citológica. Estos tumores son de crecimiento lento, pero recurren como tumores de grado superior. Pueden ser malignos o no malignos.
- Grado III: los tumores cumplen dos criterios, es decir, presentan anaplasia y actividad mitótica. Estos tumores son malignos y a menudo recurren como tumores de grado superior.
- Grado IV: los tumores cumplen con tres o cuatro criterios, es decir, muestran anaplasia, actividad mitótica con proliferación microvascular y / o necrosis. Estos tumores se reproducen rápidamente y son tumores malignos muy agresivos.

Asimismo, la tercera columna y propósito final de esta revisión, recoge la función y el uso para el que han sido empleados de manera fructífera los marcadores ki-67 y p53 en diversos estudios de la última década para los distintos tipos de tumores del Sistema Nervioso Central.

Los biomarcadores en oncología se clasifican en 3 posibles tipos en función de su utilidad¹⁶:

- Diagnósticos: definen qué enfermedad determinada está presente en la muestra del paciente.
- Pronósticos: están asociados a la supervivencia global y predicen el curso natural de la enfermedad.
- Predictivos: son útiles para predecir la eficacia de una terapia, dan información sobre la respuesta al agente terapéutico.

Gliomas

Los tumores gliales constituyen la mayoría (65%) de los tumores cerebrales intracraneales primarios. A pesar de los avances en las terapias quirúrgicas, médicas y de radioterapia, los pacientes con gliomas de alto grado suelen mostrar un mal pronóstico.

Un estudio llevado a cabo en el Segundo Hospital de la Universidad de Shandong entre junio de 2011 y febrero de 2016 incluyó un total de 40 muestras quirúrgicas de 20 pacientes con gliomas recurrentes¹⁷. Los datos clinicopatológicos, entre ellos los scores de los marcadores p53 y Ki-67 fueron recolectados y analizados. En 13 de los casos que experimentaron un aumento en el grado de malignidad, y consiguiente recurrencia (reaparición del tumor); la expresión de Ki-67 y p53 fue mayor en los tumores recurrentes en comparación con los tumores primarios ($P = 0.001$, $P = 0.045$). El grado patológico se relacionó significativamente con las puntuaciones de Ki-67 ($P < 0.001$) y p53 ($P = 0.003$). En la Universidad de Tsukuba, se llevó a cabo un ensayo clínico en el que se incluyeron 53 pacientes que se sometieron a cirugía primaria entre 1994 y 2011¹⁸. Todos los tumores fueron diagnosticados como gliomas de grado III según la clasificación de la OMS. Para extender su investigación, se recolectaron muestras de Grado II y IV. Todos los pacientes fueron sometidos a cirugía primaria en el Hospital Universitario Tsukuba (Grado II entre 1994 y 2004 y Grado IV entre 2008 y 2010).

Para los tumores de grado IV, los pacientes recibieron radioterapia, seguida de quimioterapia basada en ACNU (Nimustina) y Temozolomida. Los pacientes con tumores de grado II no se sometieron a tratamiento adicional después de la cirugía, excepto por resección y radioterapia en casos de recurrencia. Los resultados del presente estudio indican que la inmunohistoquímica combinada que incluye p53 y el índice Ki-67 es útil para la clasificación molecular de los gliomas difusos y para la evaluación del pronóstico, especialmente los gliomas de grado III y de grado inferior (es decir, grado II + III).

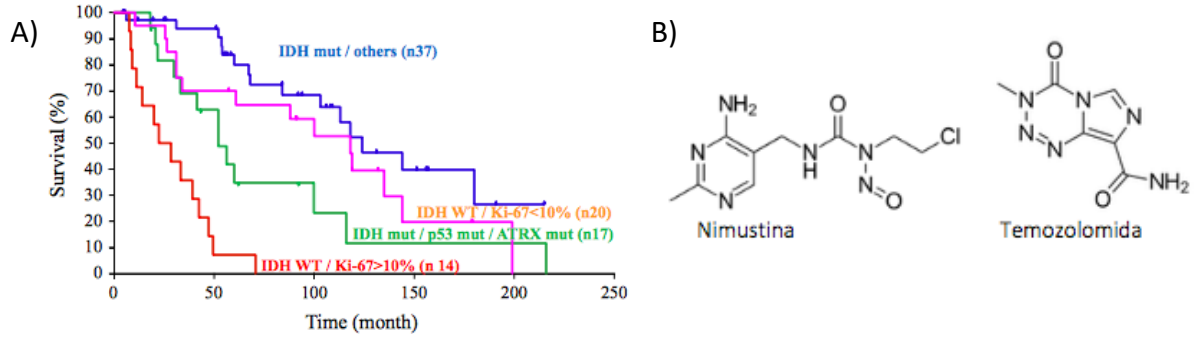


Figura 2 A) Curvas Kaplan-Meier de supervivencia general en 88 gliomas de bajo grado (i.e., Grado II + Grado III) después de la estratificación de acuerdo con, **p53**, estado de mutación y positividad de **Ki-67**. **B)** Estructuras moleculares; quimioterapia post radioterapia formada por Nimustina (ACNU) y Temozolomida.

Astrocitoma

La neoplasia glial más común durante la infancia es el astrocitoma pilocítico (AP). MIB-1 es un anticuerpo monoclonal que es inmunorreactivo con Ki-67. Este antígeno nuclear es detectable solo durante las etapas proliferativas del ciclo, representativo de los neoplásicos fenotípicamente agresivos. El MIB-1 labeling index (LI) es la fracción de células tumorales marcadas por Ki-67. La importancia pronóstica de MIB-1 LI para la supervivencia libre de progresión (SLP) en gliomas pediátricos de bajo grado se estudió en 157 niños con AP que fueron evaluados y tratados entre los años 1982 y 2001¹⁹. El estudio se llevó a cabo por el Programa de Neuro-Oncología aprobado bajo el proceso de revisión del Centro Médico Southwestern de la Universidad de Texas de acuerdo con los estándares de los Institutos

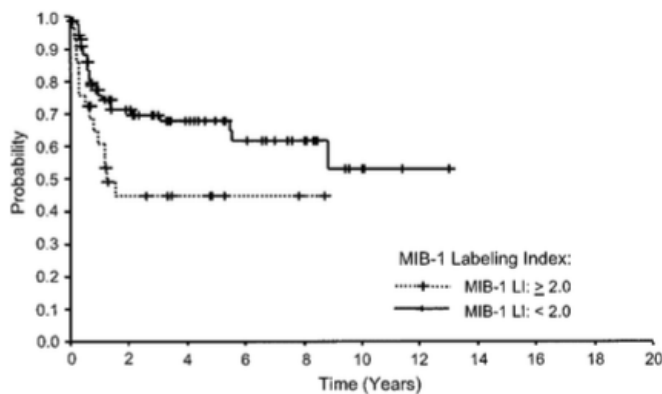


Figura 3. Supervivencia libre de progresión de 118 niños con astrocitomas pilocíticos según el índice de etiquetado MIB-1 (LI).

Nacionales de Salud. Mediante el análisis de log-rank, los AP con un MIB-1 LI de ≥ 2.0 tuvieron un intervalo libre de progresión más corto que los tumores con un MIB-1 de menos de 2.0.

En resumen, en esta serie de niños con AP, la media de MIB-1 LI fue 1,61. Un MIB-1 LI de ≥ 2.0 se asoció con una mayor frecuencia de progresión tumoral posterior por análisis de rango logarítmico (log-rank).

Otro estudio fue realizado durante un período de 2,5 años por la Sociedad India de Oncología Médica y Pediátrica, examinaron 61 tumores cerebrales pediátricos y se realizaron tinciones inmunohistoquímicas con p53 y Ki-67 en 52 de estas muestras. Además, se estableció un seguimiento de hasta 6 meses para determinar el resultado de las pruebas.

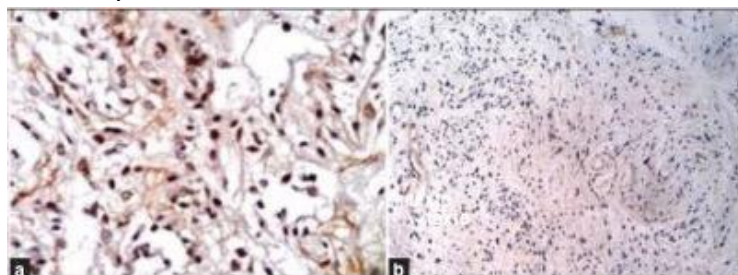


Figura 4. Áreas microquísticas en un caso de Astrocitoma Pilocítico (AP). **Foto a)** Alta expresión para p53 en astrocitoma pilocítico (AP). Aumento 400x. **Foto b)** Baja expresión para ki-67 en astrocitoma pilocítico (AP). Aumento 100x.

La expresión de Ki-67 y p53 fue significativamente más baja en los astrocitomas pilocíticos (APs) que los casos de glioma de alto grado ($P < 0.001$ y $P < 0.01$), respectivamente. Asimismo, la supervivencia de los APs fue significativamente mayor en comparación con la de los gliomas de alto grado ($P = 0.03$). Para el estudio se tomaron conjuntamente astrocitomas anaplásicos y glioblastomas como gliomas de alto grado, ya que había muy pocos casos de astrocitoma anaplásico²⁰. Tanto el score de p53 como el de Ki-67 LI en gliomas de alto grado fueron significativamente mayores que el astrocitoma infiltrante pilocítico y difuso. Coincidiendo con Pollack et al. donde describieron la sobreexpresión de p53 y su mutación como indicadores de mal pronóstico en este tipo de Astrocitomas²¹. Los pacientes con gliomas de alto grado vivieron durante un período significativamente más corto que aquellos con astrocitoma pilocítico. Ki-67 y p53 individualmente mostraron una correlación positiva significativa con el grado de astrocitoma ($P = 0.000$ y $P = 0.002$, respectivamente). Se vio que Ki-67 era un mejor marcador para diferenciar entre los grados de astrocitoma.

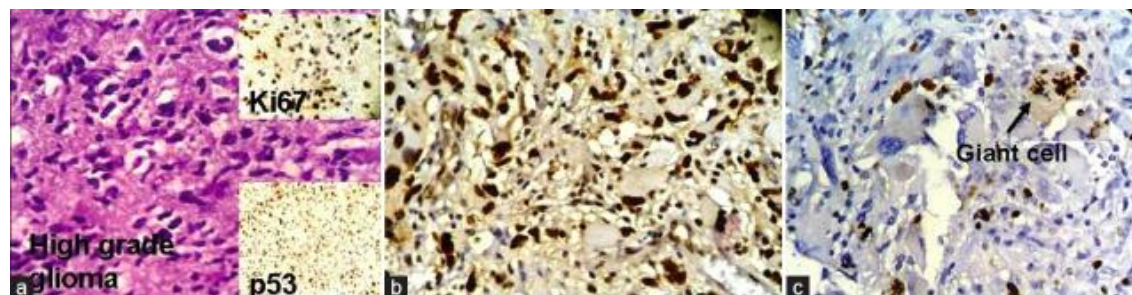
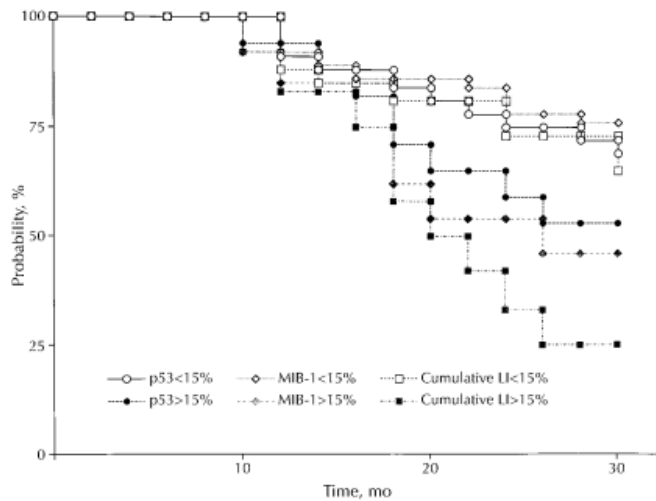


Figura 5. Inmunohistoquímica para distintas zonas de un caso de Astrocitoma Pilocítico. **Foto a)** Astrocitos pleomórficos en un caso de Astrocitoma anaplásico (glioma de alto grado); Esquina superior dcha: *high expression* de ki-67, Esquina inferior dcha: *high expression* de p53. **Foto b)** Alta expresión de p53 en glioblastoma. Aumento 400x. **Foto c)** Alta expresión ki-67 en célula gigante en división en glioblastoma. Aumento 400x.

En resumen, se concluyó que p53 y Ki-67 no solo se asociaron significativamente con la supervivencia individualmente, sino que, en conjunto, también se relacionaron significativamente con la supervivencia en pacientes con astrocitoma de acuerdo con Tihan et al. Sin embargo, Ki-67 fue un mejor marcador que p53 en las series de astrocitoma. En dicho estudio, Tihan et al. observaron el índice de marcado para Ki-67 (MIB-1) y p53 en las muestras de biopsia de astrocitomas pilocíticos y astrocitomas difusos de grado IV.



Concluyeron que los índices de etiquetado Ki-67 y p53 combinados superiores al 15% indicaban un peor desenlace y pronóstico que el sugerido por la clasificación histológica²².

Figura 6. Curva de supervivencia Kaplan-Meier para los astrocitomas difusos con p53, Ki-67 e índices de marcaje combinados (LI) para >15% y <15%. Muestra una menor supervivencia índices de etiquetado combinados superiores al 15%.

Glioblastoma (GBM)

El glioblastoma es el tumor cerebral humano maligno más frecuente. Actualmente, el pronóstico continúa siendo muy poco esperanzador, y la mayoría de los pacientes mueren dentro del primer año post diagnóstico. Los glioblastomas secundarios se desarrollan a través de la progresión de astrocitoma difuso de bajo grado o astrocitoma anaplásico. En el camino hacia el glioblastoma secundario, las mutaciones TP53 son la alteración genética detectable más frecuente y temprana. Se ha evidenciado en varios estudios, por ejemplo, para evaluación de terapias oncológicas.

En el *Institut de Cancerologie de l'Ouest*, Francia, se utilizó el índice de sobreexpresión y proliferación de p53 para comprobar la viabilidad y eficacia de prolongar la Temozolomida adyuvante (TMZ) más de 6 meses después de la finalización de la quimio-radioterapia en pacientes con glioblastoma (GBM)²³. Se confirmó que la sobreexpresión de p53 era un factor pronóstico significativo para la Supervivencia libre de progresión (SLP), con una media de SLP de 9,3 meses en comparación con 7 meses para pacientes sin sobreexpresión de p53 (P= 0.031). Aunque el ki-67 puede utilizarse también en el glioblastoma como marcador para evaluar su impacto pronóstico en función de su *score*, eventualmente se utiliza de forma indirecta, por ejemplo, un estudio de 2015 separó los glioblastomas en dos tipos en función de sus patrones microvasculares (MVPs). Se comparó la expresión de las proteínas ki67 y p53 en el glioblastoma con MVP tipo I y tipo II. El análisis estadístico reveló diferencias significativas en la expresión de Ki-67 (P = 0.010) y p53 (P = 0.019) entre los 2 grupos, lo que indica posibles relaciones entre la heterogeneidad microvascular y la proliferación celular por deficiencia de supresor tumoral²⁴.

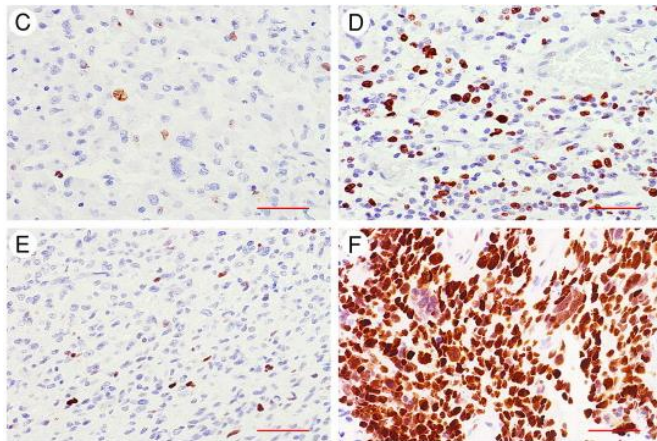


Figura 7. Fragmento de figura. Muestra la expresión de Ki-67 y p53 en distintos glioblastomas y los porcentajes de expresión considerados positivos.

c) Se consideró Ki-67 baja expresión ($\leq 30\%$) vs **d)** Ki-67 alta expresión ($> 30\%$), así como **e)** p53 negativo ($\leq 10\%$) vs **f)** p53 positivo ($> 10\%$). Barra de escala: 100 μm .

Sin embargo, se mostró un uso preferente del p53 para este tipo de cáncer, pues parece correlacionar mejor su bajo *score* e índice de proliferación con una mejor SLP. Para valores de ki-67 ($\leq 30\%$ vs. $> 30\%$) $p=0.086$ en comparación con valores p53 ($\leq 10\%$ vs. $> 10\%$) que obtuvo mayor significación estadística, $p=0.001$, con relación a la Supervivencia Libre de Proliferación (PFS). Los resultados estadísticos respecto a la Supervivencia General (OS) apoyaron esta conclusión, ya que revelaron un $p=0.016$ para valores de p53 ($\leq 10\%$ vs. $> 10\%$) en comparación con los valores para ki-67 ($\leq 30\%$ vs. $> 30\%$) con un $P=0.811^{24}$.

Actualmente se están incorporando terapias adyuvantes a la radioterapia y a la ya mencionada Temozolomida, como sería el reciente estudio publicado por la Universidad Complutense de Madrid que describe cómo una alta expresión de la Midquina (MDK), una proteína, puede utilizarse como biomarcador pronóstico además de como diana terapéutica en GBM²⁵.

Oligodendroglioma

El oligodendroglioma se forma a partir de oligodendrocitos, células presentes en el cerebro y la médula espinal cuya función radica en la producción de sustancias (mielina, etc.) que protegen las neuronas. El oligodendroglioma puede ocurrir a cualquier edad, pero afecta con mayor frecuencia a los adultos.

Desde el siglo pasado (1999), el índice de proliferación Ki-67, el índice de marcado (*score*) p53 y las mutaciones del gen TP53 se evaluaron en 59 pacientes con el fin de estudiar su valor pronóstico en función de la clasificación del tumor según la OMS, (33 oligodendrogliomas grado II según la OMS, 15 oligodendrogliomas anaplásicos, 11 glioblastomas con patrón de crecimiento oligodendroglioma). El índice de marcado para Ki-67 se correlacionó significativamente con la clasificación (según la OMS), pero no tuvo relevancia pronóstica independiente. Dado que tanto la acumulación de p53 de tipo salvaje como mutante sí se asoció con un mal pronóstico, se sugiere incluir la evaluación inmunohistoquímica de la proteína p53 en el diagnóstico rutinario de oligodendrogliomas²⁶.

En un estudio más reciente (2019), seguimos encontrando como objetivo evaluar y comparar, mediante inmunohistoquímica, el valor pronóstico de Ki-67 en una gran serie de oligodendrogliomas anaplásicos (AOs) IDH-mutantes con codelección 1p/19q. Partiendo de un *background* con pruebas obtenidas en otros estudios que parecían respaldar el valor pronóstico de Ki-67 LI con análisis univariable, pero no multivariable²⁷. La prueba de *log-rank* (rango logarítmico) y el modelo de regresión univariable Cox, revelaron que un Ki-67 LI (*labeling index* ó índice de marcado) igual o superior al 15% se correlacionó con una

supervivencia general más corta (log-rank: $P = 0.004$; Cox: $P = 0.008$; IC 95%). Se realizaron, además, dos análisis multivariable con el modelo Cox; el primero incluye edad, índice mitótico (MI), MCM6 (marcador de proliferación celular) y Ki-67.

MCM6 y Ki-67 LI se aproximaron a la significación estadística ($P = 0.058$ y $P = 0.066$, respectivamente). Para evaluar si MCM6 pudiera ser un marcador interesante para usar en complemento de Ki-67, se diseñó un segundo modelo multivariable de Cox, con la variable "MCM6 LI $\geq 50\%$ y/o Ki-67 LI $\geq 15\%$ ". Con este modelo, la nueva variable se correlacionó significativamente ($P = 0.027$) con la supervivencia general (*overall survival*, OS)²⁸. Por lo tanto, se concluyó que estos dos marcadores rentables y fáciles de usar podrían emplearse simultáneamente en la práctica rutinaria para el análisis de la patología.

Ependimoma

Los ependimomas (EP) en la actualidad se tratan mediante resección quirúrgica seguida de radioterapia. A pesar de los avances, los EP son relativamente resistentes a la quimioterapia puesto que exhibe cursos clínicos heterogéneos, en consecuencia, se necesitan nuevas terapias dirigidas y estudios destinados a la identificación de marcadores moleculares con valor clínico.

Un estudio de 2019 en México²⁹ se observó que la proteína p53 disminuye en EP anaplásico de la población mexicana; por el contrario, Alexiou et al. reportó que en pacientes caucásicos la alta expresión de p53 se correlacionaba con EP anaplásico, al igual que A Korshunov et al. que describieron como la sobreexpresión de p53 en Ependimoma anaplásico se asoció a una peor supervivencia global²¹. Estas diferencias se deben posiblemente a polimorfismos, mutaciones o factores epigenéticos que influyen en la expresión de proteínas entre las razas³⁰. Sin embargo, Ki-67 se observó sobreexpresado en todas las muestras estudiadas. Este fenómeno coincidiría con la reciente teoría de que P53 inhibe la actividad del promotor Ki-67 a través de vías dependientes de p53 que afectan la represión transcripcional del promotor Ki-67⁷. Por lo tanto, la inhibición de Ki-67 podría considerarse en el diseño de estrategias novedosas para la terapia contra el cáncer. Ki-67 se propone como un atractivo objetivo terapéutico para el cáncer ya que se expresa altamente en la mayoría de las células malignas. Estos resultados sugieren que algunas de las proteínas analizadas pueden considerarse biomarcadores pronósticos: p53 (subexpresión) y Ki-67 (sobreexpresión), ya que su *score* se correlaciona con el grado histopatológico y la recaída en EP; además Ki-67 (sobreexpresión) puede ser candidato para la evaluar la respuesta a tratamiento. Estudios de años anteriores ya habían descrito el uso de p53 y ki-67 en la clasificación de los distintos grados de Ependimoma:

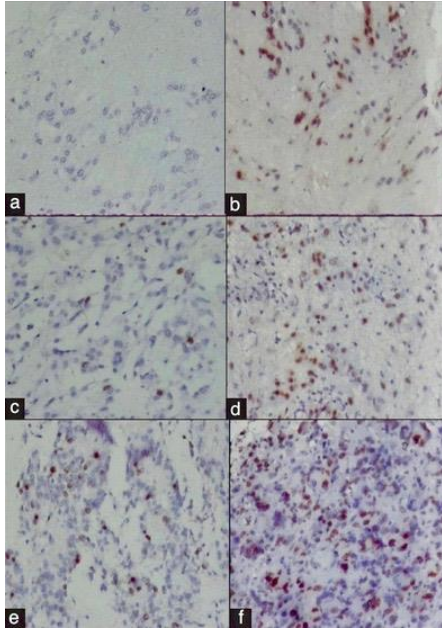


Figura 8. El índice de marcado medio para p53 fué superior en los EP de grado II (**d**) (26.27%) y grado III (26.08%) (**f**), en comparación con los subependimomas (7.25%) (**b**). Sin embargo, estos valores no mostraron significancia estadística ($P = 0.2$). El índice de marcado Ki-67 aumentó de grado I (**a**) (negativo en subependimomas) a grado III. La diferencia fue altamente significativa entre el grado II (**c**) y el grado III (**e**), (0.5% vs. 2.75, $P = 0.016$).

Se concluyó que el índice de etiquetado Ki-67 se correlacionaba con el grado de Ependimoma. Sin embargo, no se reportó correlación entre la expresión de p53 y el grado de ependimomas³¹.

Tumores embrionarios

Aunque el glioblastoma es el tumor cerebral humano maligno más frecuente, el meduloblastoma (MB) es el tumor cerebral maligno más común en la infancia. Forma parte de los tumores neuroectodermales primitivos, junto con el Ependimoblastoma y el Pineoblastoma. Debido a que la actividad proliferativa tiene con frecuencia correlación con el grado de agresividad biológica del tumor, los tumores neuroectodérmicos primitivos (PNET) de 78 pacientes, mayoritariamente meduloblastomas, bien caracterizados, fueron evaluados inmunohistoquímicamente con marcaje Ki-67 (MIB-1). Los índices de proliferación (IP) se determinaron contando las células tumorales positivas para Ki-67 (MIB-1) en la región de mayor tinción (IP de "hot-spot") o en al menos en 15 campos elegidos al azar (IP aleatorio)³². Posteriormente, en 2003, Ferrari AF et al.³³ observó que los pacientes con MIB-1 LI (*labeling index*) con valores $<30,1\%$ mostraron una probabilidad de supervivencia del 64% en 3 años y 49% en 5 años en comparación con los pacientes con valores $>30,1\%$, que mostraron una probabilidad de supervivencia del 16% en 3 años y 0% en 5 años desde el inicio del tratamiento ($P = 0.0367$). Sin embargo, la misma revista publicó en 2008 un artículo similar en que la expresión de ki-67 y/o p53 no obtuvo significancia estadística con respecto a la supervivencia del paciente. No obstante, algo a recalcar fue el hecho de que pacientes con células p53 negativas presentaron valores de Ki-67 más bajos que los pacientes con células p53 positivas. Esto podría estar relacionado con la pérdida funcional de p53 mutado, lo que permitiría una mayor proliferación de células neoplásicas³⁴.

Análisis anteriores, llevados a cabo por regresión univariable Cox revelaron que los PNET con un IP de hot-spot alto tenían un riesgo significativamente mayor de progresión y muerte que los PNET con un IP de hot-spot bajo ($P = 0.04$). El cociente de riesgo se mantuvo significativo tras ajustarse a análisis multivariable. En contraste con el IP de hot-spot, el IP aleatorio demostró no ser un predictor pronóstico significativo³².

En otro estudio clínico similar del mismo año, investigaron la importancia pronóstica de la inmunotinción de Ki-67 y p53 en el meduloblastoma. Se concluyó que la tinción nuclear intensa para p53 fue la única variable que alcanzó significación estadística para la supervivencia libre de enfermedad (*disease free survival*, DFS)³⁵. Adicionalmente, describieron

la sobreexpresión de p53 y su mutación como indicadores de mal pronóstico en MB. En estudios recientes, aunque la expresión de p53 no está muy bien correlacionada con la progresión del MB, se está usando en el desarrollo de terapias en las que se ha reconocido que bajos niveles de p53 se relacionan indirectamente con aumento de la angiogénesis y crecimiento del MB por alteraciones en su eje y vías. Estas terapias están destinadas a descubrir el factor desencadenante e inhibirlo, reactivando la expresión de p53 y suprimiendo el crecimiento del MB³⁶.

Meningioma

Es un tipo de tumor que surge de las meninges, membranas que rodean el cerebro y la médula espinal. Si bien técnicamente no se trata de un tumor cerebral, se incluye en esta categoría porque comprime o presiona el cerebro, los nervios y los vasos adyacentes. El meningioma es el tipo más frecuente de tumor que se forma en la cabeza. La naturaleza biológica de los meningiomas no se puede predecir basándose solo en aspectos histomorfológicos, dado que es un tumor de crecimiento muy lento.

En el estudio de Perry A et al. las tasas de recurrencia tumoral fueron del 7-20% en meningiomas benignos (Grado I), del 29-40% en atípicos (Grado II), del 50 al 78% de anaplásicos (Grado III). Coincidiendo con Kumar et al., que reportó una expresión de p53 creciente de los meningiomas tipo I al tipo III (0%-23.1%). H Cho et al., señalaron que la inmunopositividad de p53 y la mutación del gen TP53 se asociaron con el pronóstico de meningiomas y sirven como marcadores de progresión de estos. Wahda et al. vieron que el Ki-67 LI (*labeling index*) medio fue de $10,6 \pm 6,4$ en meningiomas anaplásicos en comparación con la de los meningiomas atípicos y benignos, que fue de $5,4 \pm 2,8$ y $1,8 \pm 3,5$ respectivamente. Kolles et al. afirmaron que, en su estudio, Ki-67 (MIB-1) LI fue el criterio más importante para distinguir los meningiomas anaplásicos (grado III de la OMS) con un *score* medio de 11%, de los meningiomas de tipo común (grado I de la OMS) que revelaron un *score* medio de 0.7% para el LI de ki-67 al anticuerpo MIB-1. En su estudio, Roser et al. se realizó análisis inmunohistoquímico en 580 casos y el Ki-67 LI aumentó en los meningiomas recurrentes en comparación con los meningiomas iniciales primarios con una correlación significativa entre la alta vascularización tumoral y el elevado Ki-67 LI.

En la actualidad, uno de los estudios más recientes en 2016, además de incluir una revisión de todos los artículos anteriormente mencionados, reveló datos similares. La expresión de Ki-67 LI y p53 se correlacionó con la graduación de meningioma del grado I (benigno) al grado III (anaplásico), mostrando su naturaleza agresiva³⁷.

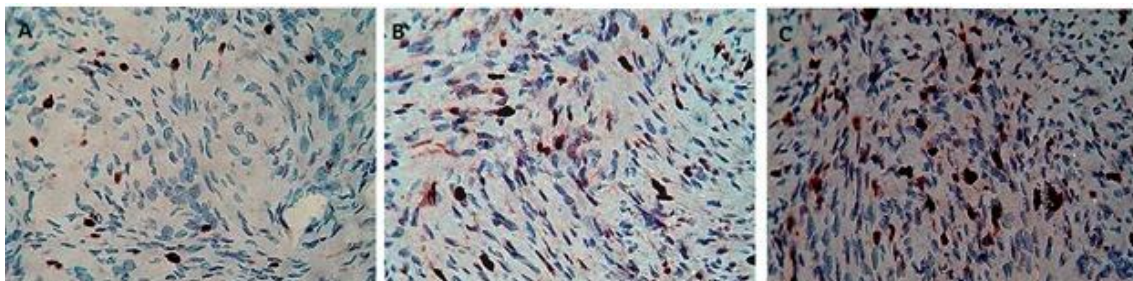


Figura 9. Tinción inmunohistoquímica para varios grados de Meningioma: índice de marcado Ki-67 en (izquierda) grado I; (centro) grado II; (derecha) Meningioma de grado III. Se muestra un progresivo aumento en el índice de marcado para ki-67 conforme aumenta el grado y la consiguiente malignidad del tumor³⁸. Aumento 400x.

Tumores de la región selar

La hipófisis o glándula pituitaria es una glándula endocrina del tamaño de un guisante situada en la base del cerebro, produce hormonas que afectan el crecimiento y las funciones de las otras glándulas del cuerpo.

En un estudio reciente del año 2019, observaron que un alto índice de proliferación de Ki-67 tuvo valor predictivo para la recurrencia en los adenomas hipofisarios. El tamaño del tumor, la presencia de macroadenoma (tumor con tamaño ≥ 1 cm) y la invasión en la RM (resonancia magnética) pituitaria fueron mayores en los tumores con un alto índice de proliferación de Ki-67. El índice mitótico y la expresión de p53 no se asociaron con el riesgo de recurrencia. Sin embargo, la presencia de dos criterios de agresividad histopatológica se asoció con recurrencia³⁸. Los datos sobre la relación entre el índice de proliferación Ki-67, la invasividad y la recurrencia de los adenomas pituitarios han sido debatidos. En un estudio retrospectivo, Zaidi et al. informó sobre el hecho de que el tamaño del tumor, la invasión del seno cavernoso

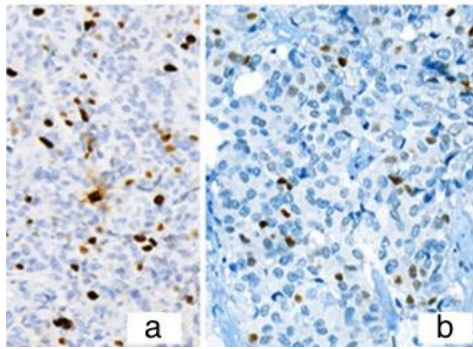


Figura 10. Adenoma pituitario (AP) **a)** Alto índice de proliferación de Ki-67 (5%). **b)** Células tumorales que muestran expresión de P53 (22%)³⁸.

en la resonancia magnética y un alto índice de proliferación de Ki-67 se asociaron significativamente con la agresividad del tumor. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre los AP (adenomas pituitarios) típicos y atípicos con respecto al riesgo de recurrencia. En el estudio de Del Basso De Caro, no se encontró que el índice de proliferación Ki-67 estuviera relacionado con el riesgo de agresividad o invasividad de las AP atípicas³⁹.

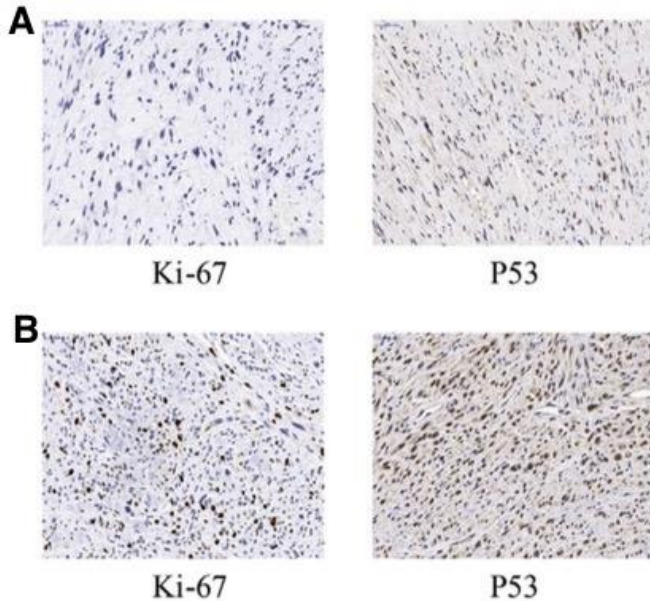
La recurrencia del craneofaringioma (CP) es un problema debido a la naturaleza impredecible de los CP recurrentes junto a su morbilidad y mortalidad asociadas. En los últimos 10 años se han publicado únicamente dos grandes revisiones, la primera en 2012 por Prieto Et al., un metanálisis que concluyó sobre la necesidad de estudios adicionales de marcadores de recurrencia de CP⁴⁰. Y la última y más reciente en 2020, coincide con el anterior en que las tasas de recurrencia asociadas con p53 individualmente carecen de consenso. Sí insinúa que los altos niveles de Survivina (inhibidor de la apoptosis) y p53 juntos podrían correlacionarse con una mayor probabilidad de recurrencia tumoral. Sin embargo, en desacuerdo con Prieto Et al., un análisis amplio ha reportado evidencias de que Ki-67 es un marcador fiable³⁸.

Estos hallazgos incoherentes pueden deberse a la distribución heterogénea de Ki-67 dentro de cada muestra, lo que hace que los resultados sean muy dependientes de cada usuario. Hasta la fecha, sin embargo, los índices Ki-67 (MIB-1) siguen siendo marcadores comunes para el pronóstico de craneofaringiomas tratados quirúrgicamente y su riesgo de recurrencia⁴¹. La presencia de estos marcadores en el nicho del tumor debería fomentarse en la búsqueda de radioterapia a pesar de la morbilidad, dado el alto riesgo de recurrencia.

Tumores de nervios craneales y paraespinales

El objetivo del último metanálisis realizado en 2019 sobre este tipo de tumores fue identificar y evaluar la información disponible sobre los resultados del tratamiento quirúrgico de los neuromas dolorosos. Los neuromas malignos de los nervios periféricos son incapacitantes psicológica y físicamente. Los resultados de esta revisión son coincidentes con los trabajos publicados anteriormente confirmando el hecho de que el 20-30% de los neuromas serán refractarios al tratamiento, independientemente del tipo de cirugía realizada⁴².

El Schwannoma es un tipo de neuroma que consiste aproximadamente el 25% de todos los tumores espinales, pero hay poca literatura publicada sobre este tema. En un estudio reciente



de 2018 se incluyeron un total de 524 pacientes con Schwannoma espinal. Se concluyó que la supervivencia general estuvo estrechamente relacionada con la recurrencia, la ubicación en el sacro, el grado de patología, el índice de marcado (LI) Ki-67 y la expresión de p53. Un índice de etiquetado Ki-67 > 5% no resultó ser sólo un indicio característico de subtipo maligno, sino también un indicador pronóstico de recurrencia y supervivencia deficiente. Por otro lado, se reportó también que los tumores p53 positivos se asociaban con un pronóstico desfavorable⁴³.

Figura 11. Inmunohistoquímica de (A) Schwannoma espinal benigno y (B) maligno.

Un estudio de 2014 sobre las características morfológicas e inmunohistoquímicas de los tumores malignos de la vaina de nervios periféricos y los Schwannomas celulares ha sido recientemente revisado y de nuevo publicado en 2019, en él se revisaron 115 tumores malignos de la vaina de nervios periféricos y 26 casos de Schwannoma celular.

La expresión de la proteína p53 se ha asociado con un peor desenlace en el tumor maligno de la vaina del nervio periférico. En el conjunto de datos de este estudio, los casos de tumor maligno de la vaina del nervio periférico con falta de expresión de p53 mostraron una peor supervivencia específica de la enfermedad, aunque no alcanzó significación estadística. Los casos de tumor maligno de la vaina del nervio periférico que tenían índices de proliferación de Ki-67 más altos presentaron una supervivencia específica menor ($P=0.048$), aunque se superponían significativamente con el Schwannoma celular⁴⁴.

Tumores de plexos coroideos

Los plexos coroideos son estructuras vasculares del encéfalo encargadas de la formación del líquido cefalorraquídeo que protege al sistema nervioso central.

En general, los papilomas (CPP) y carcinomas (CPC) de plexos coroideos son raros, sin embargo, representan entre el 10 y el 20% del total de tumores cerebrales diagnosticados en niños desde el nacimiento hasta el año de edad. La evidencia acumulada de varios estudios

muestra que CPP y CPC están fuertemente asociados con familias que portan mutaciones en la línea (vía) germinal de TP53. Tabori et al.⁴⁵ encontraron mutaciones en la línea germinal de TP53 en el 50% de los CPC. Los pacientes con CPC carente de dicha mutación (TP53 *Wild Type*) tuvieron un pronóstico favorable y pudieron tratarse con éxito sin necesidad de radioterapia. A pesar de que hasta ahora sólo se han identificado casos dispersos de CPC con mutaciones somáticas de TP53, esto sugiere que las mutaciones somáticas de TP53, además de sus mutaciones en la línea germinal, podrían estar involucradas también en la patogénesis del CPC pediátrico⁴⁶.

Si bien otros estudios no llevaron a cabo un análisis mutacional para p53 en este tipo de tumores, si observaron que el índice de etiquetado de p53 en CPC fue significativamente mayor que en CPP, siendo la supervivencia media de los pacientes con CPP de 8,5 años en comparación con 5,2 años para los pacientes con CPC. La expresión de MIB-1 (ki-67) y p53 fue significativamente menor en pacientes con CPC tras la quimioterapia que antes de esta. Coincidiendo con Carlotti Jr et al. que observaron que una elevada expresión de ki-67 fue un indicador de mal pronóstico en CPC²¹. Asimismo, el índice de etiquetado MIB-1 para pacientes con CPC vivos y recuperados tiempo después de los tratamientos fue de $15,19 \pm 3,2$ en comparación con $22,63 \pm 3,04$ para los pacientes que murieron a causa del tumor ($P < 0.05$). Se concluyó que la quimioterapia (ciclos mensuales de Ifosfamida, Carboplatino y Etopósido, llamada quimioterapia ICE) Fig.12, podría funcionar en CPC para disminuir su potencial proliferativo y la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular⁴⁷.

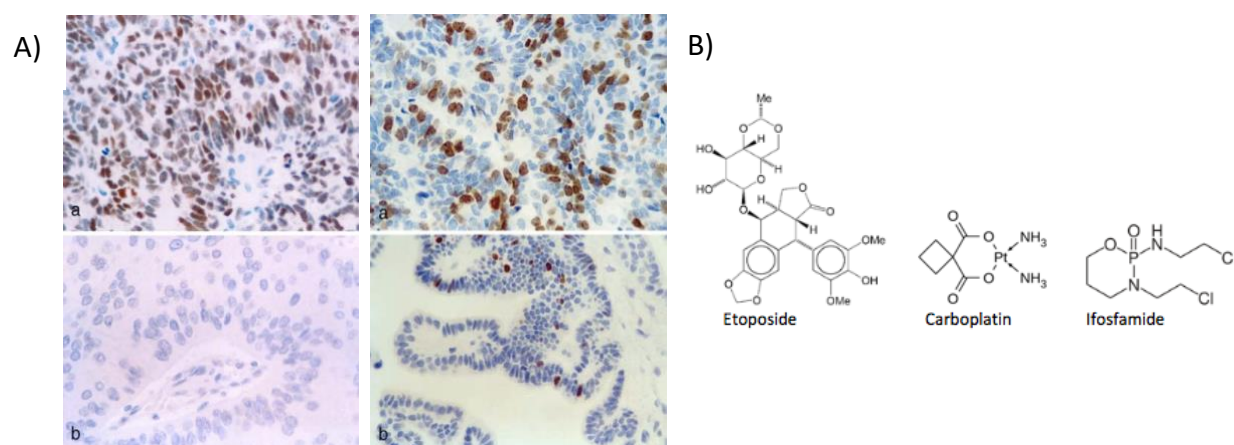


Figura 12 A) Columna izqda., Inmunotinción para p53; **a)** CPC, neoplasia positiva, prácticamente todas las células teñidas; **b)** CPP, muestra ausencia de tinción. Columna dcha., Inmunotinción para MIB-1; **a)** CPC, muestra un índice de etiquetado de 27,3; **b)** CPP, muestra un índice de etiquetado de 4,1. **B)** Estructuras moleculares; compuestos de la quimioterapia ICE (Ifosfamida, Carboplatino y Etopósido).

Tumores de la región pineal

La región pineal da lugar a una variedad de lesiones neoplásicas y no neoplásicas de potencial maligno variable. Sin embargo, a pesar de esta variedad, los tumores de la región pineal en general siguen siendo raros y representan menos del 1% de todos los intracraneales.

Los pineocitomas y los pineoblastomas malignos (también llamados Glioblastomas pineales) son muy raros, con apenas casos descritos en la literatura. La epidemiología, la patogénesis y el tratamiento de estas lesiones están pobremente caracterizados. A pesar de su rareza, se ha

descrito en artículos recientes el uso de tinción con inmunoperoxidasa para estudiar los tumores pineales malignos de 8 pacientes, se realizó en secciones embebidas en parafina usando anticuerpos para ki-67 y p53 entre otros. Los análisis inmunohistoquímicos demostraron una elevada actividad proliferativa en los tumores. El índice Ki-67 medio fue del 24,3% (rango 5,2-50%) en siete pacientes. La tasa mitótica elevada y el índice de proliferación Ki-67 respaldaron el diagnóstico de una lesión de Grado III de la OMS.

Aunque no se menciona ninguna correlación de p53 con el grado ni el pronóstico tumoral, dos de los pacientes disponían de perfil genético secuenciado, y se describió en ellos mutaciones de significación incierta que incluían, en concreto, variantes en TP53⁴⁸. Estudios anteriores coincidieron mayoritariamente con los resultados, incluso se utilizaron ambos marcadores con el fin de predecir el pronóstico tumoral post tratamiento con Temozolomida (TMZ), agente alquilante oral que se usa ampliamente en el tratamiento del glioblastoma (descrito anteriormente en esta revisión).

El índice de etiquetado para MIB-1 (clon de ki-67) se correlacionó con el grado de malignidad de la OMS, aunque la inmunoreactividad de p53 no, en concordancia con anteriores estudios. Once de doce casos de demostraron expresión de otros marcadores que sugirieron quimiorresistencia al tratamiento con TMZ para este tipo de tumores⁴⁹.

Conclusiones

Tras esta revisión podemos confirmar que, en las últimas décadas, el enfoque tradicional para el diagnóstico de tumores del sistema nervioso central ha cambiado hacia un nuevo enfoque de orientación molecular. Excepto por algunos estudios puntuales, se ha demostrado una asociación significativa entre Ki-67 LI (MIB-1) y un grado tumoral elevado, siendo un indicador fiable del estado del tumor y pudiendo así guiar los enfoques de tratamientos y pronósticos clínicos. Asimismo, altos niveles de p53 se han asociado con un mal pronóstico y se correlacionan con el grado tumoral, siendo en múltiples ocasiones utilizados ambos marcadores simultáneamente, o en combinación con otros. No obstante, la relación entre los niveles de expresión de ki-67 y p53 está aún poco descrita, esto podría deberse mayormente a que, en células sanas, p53 (debido a su corta vida), es normalmente indetectable por inmunohistoquímica, de forma que altos niveles de esta corresponderían a mutaciones.

Tras las conclusiones obtenidas se insta a realizar nuevos estudios en los que los perfiles moleculares inmunohistoquímicos vengán acompañados de un perfil genético de los marcadores en cuestión, así como a investigar nuevas combinaciones posibles entre marcadores que aporten cada vez, un mapa más detallado de la identidad de estos tumores.

Agradecimientos: Dr. Juan Colás Rubio (Hospital Nuestra Sra. Del Prado, Talavera de la Reina), por la ayuda prestada en la elección de las resonancias magnéticas.

Bibliografía

1. <https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer/sistema-nervioso-central/evolucion-tumores-sistema-nervioso-central>
2. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>
3. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. Acta Neuropathol. 2016;131(6):803-20.
4. <https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis->

- [staging/diagnosis/tumor-markers-fact-sheet](#)
5. Stalpers LJA, Dieleman EMT, van Westing BRH, Postma TJ, van Furth WR. [Diagnosis and treatment of brain tumours]. *Ned Tijdschr Tandheelkd.* abril de 2009;116(4):202-7.
 6. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer.* 15 de enero de 1983;31(1):13-20.
 7. Sun X, Kaufman PD. Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma.* 2018;127(2):175-86.
 8. Elmaci İ, Altinoz MA, Bolukbasi FH, Yapicier O, Sav A. Paradoxical results obtained with Ki67-labeling and PHH3-mitosis index in glial tumors: a literature analysis. *Clin Neuropathol.* diciembre de 2017;36(6):272-82.
 9. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature.* 2 de julio de 1992;358(6381):15-6.
 10. Harris SL, Levine AJ. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene.* 18 de abril de 2005;24(17):2899-908.
 11. Freed-Pastor WA, Prives C. Mutant p53: one name, many proteins. *Genes Dev.* 15 de junio de 2012;26(12):1268-86.
 12. Aubrey BJ, Kelly GL, Janic A, Herold MJ, Strasser A. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death Differ.* enero de 2018;25(1):104-13.
 13. Ramos-Vara JA. Principles and Methods of Immunohistochemistry. *Methods Mol Biol.* 2017;1641:115-28.
 14. Taylor CR. Predictive Biomarkers and Companion Diagnostics. The Future of Immunohistochemistry – ‘in situ proteomics’, or just a ‘stain’? *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* septiembre de 2014;22(8):555-61.
 15. da Silva B, Mathew RK, Polson ES, Williams J, Wurdak H. Spontaneous Glioblastoma Spheroid Infiltration of Early-Stage Cerebral Organoids Models Brain Tumor Invasion. *SLAS discovery: Advancing Life Sciences R&D.* 1 de septiembre de 2018;23(8):862-8.
 16. Molina Romero M, Laserna Mendieta EJ, Varo Sánchez GM, Alonso-Cerezo MC, Orera Clemente M. Oncología personalizada: principales biomarcadores en el pronóstico y tratamiento de tumores sólidos. *Laboratorio Clínico.* 1 de julio de 2019;12(3):e1-8.
 17. Jiang J, Wang S, Chen Y, Wang C, Qu C, Liu Y. Immunohistochemical characterization of lymphangiogenesis-related biomarkers in primary and recurrent gliomas. *Medicine (Baltimore)* 2018;97(39).
 18. Takano S, Ishikawa E, Sakamoto N, Matsuda M, Akutsu H, Noguchi M, et al. Immunohistochemistry on IDH 1/2, ATRX, p53 and Ki-67 substitute molecular genetic testing and predict patient prognosis in grade III adult diffuse gliomas. *Brain Tumor Pathol.* abril de 2016;33(2):107-16.
 19. Bowers DC, Gargan L, Kapur P, Reisch JS, Mulne AF, Shapiro KN, et al. Study of the MIB-1 labeling index as a predictor of tumor progression in pilocytic astrocytomas in children and adolescents. *J Clin Oncol.* 1 de agosto de 2003;21(15):2968-73.
 20. Sengupta S, Chatterjee U, Banerjee U, Ghosh S, Chatterjee S, Ghosh AK. A study of histopathological spectrum and expression of Ki-67, TP53 in primary brain tumors of pediatric age group. *Indian J Med Paediatr Oncol.* 2012;33(1):25-31.
 21. <http://conganat.cs.urjc.es/ojs/index.php/conganat/article/view/151/48.html>
 22. Tihan T, Davis R, Elowitz E, DiCostanzo D, Moll U. Practical value of Ki-67 and p53 labeling indexes in stereotactic biopsies of diffuse and pilocytic astrocytomas. *Arch Pathol Lab Med.* enero de 2000;124(1):108-13.
 23. Malkoun N, Chargari C, Forest F, Fotso M-J, Cartier L, Auberdic P, et al. Prolonged temozolomide for treatment of glioblastoma: preliminary clinical results and prognostic value of p53

- overexpression. *J Neurooncol.* enero de 2012;106(1):127-33.
24. Chen L, Lin Z-X, Lin G-S, Zhou C-F, Chen Y-P, Wang X-F, et al. Classification of microvascular patterns via cluster analysis reveals their prognostic significance in glioblastoma. *Human Pathology.* 1 de enero de 2015;46(1):120-8.
25. López-Valero I, et al. Midkine signaling maintains the self-renewal and tumorigenic capacity of glioma initiating cells. *Theranostics.* 6 de abril de 2020;10(11):5120-36.
26. Hagel C, Krog B, Laas R, Stavrou DK. Prognostic relevance of TP53 mutations, p53 protein, Ki-67 index and conventional histological grading in oligodendrogliomas. *J Exp Clin Cancer Res.* septiembre de 1999;18(3):305-9.
27. Preusser M, Hoefftberger R, Woehrer A, Gelpi E, Kouwenhoven M, Kros JM, et al. Prognostic value of Ki67 index in anaplastic oligodendroglial tumours--a translational study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor Group. *Histopathology.* mayo de 2012;60(6):885-94.
28. Pouget C, Hergalant S, Lardenois E, Lacomme S, Houlgatte R, Carpentier C, et al. Ki-67 and MCM6 labeling indices are correlated with overall survival in anaplastic oligodendroglioma, IDH1-mutant and 1p/19q-codeleted: a multicenter study from the French POLA network. *Brain Pathol.* 27 de septiembre de 2019;
29. Pérez-Ramírez M, García-Méndez A, Siordia-Reyes AG, Chavarría A, Gómez C, García-Hernández N. Pediatric ependymoma: GNAO1, ASAH1, IMMT and IPO7 protein expression and 5-year prognosis correlation. *Clin Neurol Neurosurg.* noviembre de 2019;186:105488.
30. G.A. Alexiou, K. Stefanaki, M. Moschovi, A. Patereli, N. Prodromou, O. Karentzou, Immunohistochemical expression of cell cycle/apoptosis regulators and epidermal growth factor receptor in pediatric intracranial ependymomas, *J. Child. Neurol.* 26 (2011) 195–198,
31. Manasa LP, Uppin MS, Sundaram C. Correlation of p53 and Ki-67 expression with grade and subtype of ependymoma. *Indian J Pathol Microbiol.* septiembre de 2012;55(3):308-13.
32. Grotzer MA, Georger B, Janss AJ, Zhao H, Rorke LB, Phillips PC. Prognostic significance of Ki-67 (MIB-1) proliferation index in childhood primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Medical and Pediatric Oncology.* 1 de febrero de 2001;36(2):268-73.
33. Ferrari AF, Araújo MBM, Aguiar PH, Plese JPP. Medulloblastoma: evaluation of proliferative index by monoclonal antibody Mib-1, its prognostic correlation and therapeutic implications. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria.* septiembre de 2003;61(3A):547-51.
34. Meurer RT, Martins DT, Hilbig A, Ribeiro M de C, Roche AV, Barbosa-Coutinho LM, et al. Immunohistochemical expression of markers Ki-67, neuron, synaptophysin, p53 and HER2 in medulloblastoma and its correlation with clinicopathological parameters. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria.* junio de 2008;66(2B):385-90.
35. Woodburn RT, Azzarelli B, Montebello JF, Goss IE. Intense P53 Staining is a Valuable Prognostic Indicator for Poor Prognosis in Medulloblastoma/central Nervous System Primitive Neuroectodermal Tumors. *J Neurooncol.* 1 de marzo de 2001;52(1):57-62.
36. Zhu D, Osuka S, Zhang Z, Reichert ZR, Yang L, Kanemura Y, et al. BAI1 Suppresses Medulloblastoma Formation by Protecting p53 from Mdm2-Mediated Degradation. *Cancer Cell.* 11 de 2018;33(6):1004-1016.e5.
37. Telugu RB, Chowhan AK, Rukmangadha N, Patnayak R, Phaneendra BV, Prasad BCM, et al. Histopathological and Immunohistochemical Evaluation of Meningiomas with Reference to Proliferative Markers p53 and Ki-67. *J*

- Clin Diagn Res. enero de 2016;10(1):EC15-9.
38. Hasanov R, Aydoğan Bİ, Kiremitçi S, Erden E, Güllü S. The Prognostic Roles of the Ki-67 Proliferation Index, P53 Expression, Mitotic Index, and Radiological Tumor Invasion in Pituitary Adenomas. *Endocr Pathol.* marzo de 2019;30(1):49-55.
 39. Del Basso De Caro M, Solari D, Pagliuca F, Villa A, Guadagno E, Cavallo LM, et al. Atypical pituitary adenomas: clinical characteristics and role of ki-67 and p53 in prognostic and therapeutic evaluation. A series of 50 patients. *Neurosurg Rev.* enero de 2017;40(1):105-14.
 40. Prieto R, Pascual JM, Subhi-Issa I, Jorquera M, Yus M, Martínez R. Predictive factors for craniopharyngioma recurrence: a systematic review and illustrative case report of a rapid recurrence. *World Neurosurg.* junio de 2013;79(5-6):733-49.
 41. Coury JR, Davis BN, Koumas CP, Manzano GS, Dehdashti AR. Histopathological and molecular predictors of growth patterns and recurrence in craniopharyngiomas: a systematic review. *Neurosurg Rev.* febrero de 2020;43(1):41-8.
 42. Poppler LH, Parikh RP, Bichanich MJ, Rebehn K, Bettlach CR, Mackinnon SE, et al. Surgical interventions for the treatment of painful neuroma: a comparative meta-analysis. *Pain.* febrero de 2018;159(2):214-23.
 43. Li B, Li J, Miao W, Zhao Y, Jiao J, Wu Z, et al. Prognostic Analysis of Clinical and Immunohistochemical Factors for Patients with Spinal Schwannoma. *World Neurosurg.* diciembre de 2018;120:e617-27.
 44. Pekmezci M, Reuss DE, Hirbe AC, Dahiya S, Gutmann DH, von Deimling A, et al. Morphologic and Immunohistochemical Features of Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors and Cellular Schwannomas. *Mod Pathol.* febrero de 2015;28(2):187-200.
 45. Tabori U, Shlien A, Baskin B, Levitt S, Ray P, Alon N, et al. TP53 alterations determine clinical subgroups and survival of patients with choroid plexus tumors. *J Clin Oncol.* 20 de abril de 2010;28(12):1995-2001.
 46. Lv S-Q, Song Y-C, Xu J-P, Shu H-F, Zhou Z, An N, et al. A novel TP53 somatic mutation involved in the pathogenesis of pediatric choroid plexus carcinoma. *Med Sci Monit.* 1 de mayo de 2012;18(5):CS37-41.
 47. Carlotti CG, Salhia B, Weitzman S, Greenberg M, Dirks PB, Mason W, et al. Evaluation of proliferative index and cell cycle protein expression in choroid plexus tumors in children. *Acta Neuropathol.* enero de 2002;103(1):1-10.
 48. D'Amico RS, Zanazzi G, Wu P, Canoll P, Bruce JN. Pineal region glioblastomas display features of diffuse midline and non-midline gliomas. *J Neurooncol.* octubre de 2018;140(1):63-73.
 49. Kanno H, Nishihara H, Oikawa M, Ozaki Y, Murata J, Sawamura Y, et al. Expression of O⁶-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) and immunohistochemical analysis of 12 pineal parenchymal tumors. *Neuropathology.* diciembre de 2012;32(6):647-53.