



**UNIVERSIDAD DE SEVILLA. FACULTAD DE MEDICINA**

---

*Departamento de Cirugía*

*Programa de Doctorado en Biología Molecular, Biomedicina e  
Investigación Clínica*

Tesis Doctoral

**Inmunolocalización de la Sustancia P y del  
receptor NK-1R en el Craneofaringioma  
Adamantinomatoso**

Doctorando:	Carlos Alcaide Álvarez
Tutor-Director:	Dr. Prof. Francisco Esteban Ortega
Director:	Dr. D. Miguel Muñoz Sáez



DR. PROF. DON FRANCISCO ESTEBAN ORTEGA, DOCTOR EN MEDICINA  
POR LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA Y PROFESOR TITULAR DEL ÁREA DE  
CONOCIMIENTO DE OTORRINOLARINGOLOGÍA ADSCRITO AL  
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

CERTIFICA:

Que, bajo su dirección y tutorización, el Licenciado en Medicina, D. Carlos Alcaide Álvarez, ha realizado el trabajo titulado “Inmunolocalización de la Sustancia P y del Receptor NK-1R en el Craneofaringioma Adamantinomatoso”. Reuniendo todas las características exigibles desde el punto legal y científico para que con su defensa pueda alcanzar el título de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Sevilla a 30 de marzo de dos mil veintitrés

Fdo.: Prof. Dr. Francisco Esteban Ortega

DR. D. MIGUEL MUÑOZ SÁEZ, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA  
POR LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

CERTIFICA:

Que bajo su dirección el Licenciado en Medicina y Cirugía, D. Carlos Alcaide Álvarez, ha realizado el trabajo titulado “Inmunolocalización de la Sustancia P y del Receptor NK-1R en el Craneofaringioma Adamantinomatoso”. Reuniendo todas las características exigibles desde el punto legal y científico para que con su defensa pueda alcanzar el título de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Sevilla a 30 de marzo de dos mil veintitrés

Fdo.: Dr. D. Miguel Muñoz Sáez

D. CARLOS ALCAIDE ÁLVAREZ, LICENCIADO EN MEDICINA POR LA  
FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA

CERTIFICA:

Que es el autor del trabajo titulado “Inmunolocalización de la Sustancia P y del Receptor NK-1R en el Craneofaringioma Adamantinomatoso”.

Este trabajo ha sido tutelado por el Dr. D. Francisco Esteban Ortega, Profesor Titular del Área de Conocimiento de Otorrinolaringología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla y dirigido por los Doctores en Medicina Prof. Francisco Esteban Ortega y D. Miguel Muñoz Sáez.

Y para que así conste, se expide el presente certificado

Sevilla a 30 de marzo de dos mil veintitrés

Fdo.: D. Carlos Alcaide Álvarez

A todos aquellos niños que se fueron porque  
la ciencia aun no conocía la respuesta a su enfermedad.

*“Los médicos del futuro tal vez se rían de nuestra mezcla de primitivos cócteles de venenos para eliminar la enfermedad más elemental y magistral conocida por nuestra especie. Pero mucho, en esta batalla, seguirá siendo igual: la implacabilidad, la inventiva, la resiliencia, la inquieta oscilación entre el derrotismo y la esperanza, la pulsión hipnótica de búsqueda de soluciones universales, la decepción de la derrota, la arrogancia y la desmesura (...) pero la historia del cáncer- no es la de los médicos que luchan y sobreviven, pasando de una institución a otra. Es la historia de los pacientes que luchan y sobreviven, pasando de un muro de contención de la enfermedad a otro. La resiliencia, la inventiva y la capacidad de supervivencia -cualidades a menudo atribuidas a los grandes médicos- son cualidades reflejas, que emanan ante todo de quienes luchan con la enfermedad y solo después aparecen, como proyectadas en un espejo, en quienes los tratan. Si la historia de la medicina se cuenta a través de las historias de los médicos, es porque sus contribuciones ocupan el lugar del heroísmo más sustantivo de sus pacientes.”*

*Siddhartha Mukherjee. El emperador de todos los males.*





## Agradecimientos

Quisiera agradecer la codirección y tutorización de la tesis por parte del Prof. Dr. por la Universidad de Sevilla: Francisco Esteban Ortega, médico especialista en otorrinolaringología y profesor universitario de la Universidad de Sevilla. Quiero reconocer que fue la primera persona con la que pudiera realizar una publicación científica, en ese tiempo siendo un mero estudiante universitario.

Agradecer la codirección realizada por el Doctor Miguel Muñoz Sáez, médico especialista en pediatría y doctor de la Universidad de Sevilla por haber sabido ver en mí las cualidades necesarias para convertirme doctor. Reconocer su importante labor investigadora en el estudio de la SP, del cáncer y de la pediatría junto a su apoyo constante al resto de jóvenes investigadores que en muchos casos fuimos además sus médicos internos residentes y que pudimos aprender medicina intensiva pediátrica junto a él.

Reconocer el apoyo prestado por el Prof. Dr. Francisco José Pérez Rodríguez, anatomopatólogo con extensa experiencia profesional y profesor de la Universidad CEU San Pablo, por el análisis del material anatomopatológico y al Prof. Dr. José Miguel Cárdenas Rebollo, matemático y profesor universitario de la Universidad CEU San Pablo, por el procesamiento de los datos obtenidos.

Agradecer la ayuda prestada por Carolina Castilla responsable del banco de tumores de Virgen Del Rocío-IBIS con la preparación del material usado para la investigación. Destacar su laboriosidad y el esfuerzo diario.

Al igual, quisiera agradecer a el Dr. Eloy Rivas, patólogo del Hospital Universitario Virgen Del Rocío por sus consejos en la interpretación de las preparaciones histológicas.

Por último, gracias a María José Torres-Ternero Álvarez en el diseño gráfico.

## Abreviaturas

ACTH: Adenocorticotropina

APC: Anaphase-Promoting Complex

BMP: *Bone Morphogenic Protein*

CAF: Fibroblasto Asociado a Cáncer

CC: *Cluster Cells*

CFA: Craneofaringioma Adamantinomatoso

CPI: Checkpoint Inhibitor

CSC: *Cancer Stem Cell*

CXCL12: *CXC motif chemokine ligand 12*

CXCR4: *CXC motif chemokine receptor 4*

DI: Diabetes Insípida

DSH: *Dishevered*

DVE: Válvula de Derivación Externa

EE: Epitelio en Empalizada

EGF: Factor de Crecimiento Epidérmico

EGFR: Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico

EMA: Antígeno Epitelial de Membrana

FGF: Factor de Crecimiento Fibroblástico

FGFR: Receptor del Factor de Crecimiento Fibroblástico

FOXM1; *Forkhead box M1*

Fz: *Frizzled*

GCT: Tumor de Células Germinales

GH: Hormona de Crecimiento

GSK3B: *Glycogen Synthase Kinase 3 Beta*

GTR: *Gross Tumor Resection* o Resección extensa.

HIF-1  $\alpha$ : Factor Inducible por Hipoxia 1- $\alpha$

HGF: Factor de Crecimiento Hepatocitario

HTIC: Hipertensión Intracraneal

IDO: 2,3-deoxigenasa-1

IL: Interleuquina.

IFN- $\alpha$ : Interferón alfa.

LCR: Líquido Cefalorraquídeo

LEF: *Lymphoid Enhancer Factor*

LGALS1: Galactina-1

MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase

MAT: Microambiente Tumoral

MMP: Metalopeptidasa de la Matriz Extracelular

mTOR: *Mammalian Target Of Rapamycin*

NF- $\kappa$ B: Factor Nuclear- Kappa B

NK-1R: Receptor de Neurokinina-1

PDGF: Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas

PI3K: *Phosphoinositide 3-kinase (PI3K)*

pLGG: Glioma de Bajo Grado Pediátrico

RM: Resonancia Magnética

RNA: Ácido Ribonucleico

RT: Radioterapia

SASP: Fenotipo Secretor Asociado a Senescencia

SEER: *Surveillance Epidemiology and End Results*

SIADH: Secreción Inadecuada de Hormona Antidiurética

SHH: Vía *Sonic Hedgehog*

Shh: *molécula Sonic Hedgehog*

SP: Sustancia P

TAM: Macrófago asociado a tumores

TC: Tomografía Computerizada

TCF: *T-cell Factor*

TGF $\beta$ : Factor de Crecimiento Tumoral Beta

TNF $\alpha$ : Factor de Necrosis Tumoral alfa

**TSH:** Tirotroponina

**VDV:** Válvula de Derivación Ventricular.

**VEGF:** Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular

**WNT:** Vía *Wingless*

**Wnt:** Ligando *Wingless*

## Resumen

**Introducción:** el Craneofaringioma Adamantinomatoso (CFA) consiste en un tumor cerebral cuyo tratamiento conlleva secuelas inasumibles. En los últimos años se ha demostrado que el CFA sigue un modelo de desarrollo de Fenotipo Secretor Asociado a Senescencia (SASP) donde se emiten sustancias paracrinas que establecen un microambiente tumoral invasor. La Sustancia P (SP) y el receptor de Neurokinina 1 (NK-1R) han sido descritos como potenciadores del efecto oncogénico y el bloqueo de NK-1R como un tratamiento oncolítico en un amplio número de tumores.

**Objetivos:** describir la presencia y distribución de la SP y del NK-1R en el CFA y en la adenohipófisis.

**Material y Método:** se obtienen 86 microarrays tisulares de CFA sobre los que se tiñen con anticuerpos específicos contra SP y NK-1R. Los datos obtenidos se valoran con escalas ordinales y se les aplica T-student para observar la expresión y distribución de la SP y NK-1R en las diferentes áreas del CFA y comparar dicha expresión con respecto a adenohipófisis sana.

**Resultados:** Se describe por primera vez la expresión de la SP y el NK-1R en el CFA y en la adenohipófisis. La expresión de la SP y el NK-1R es más intensa en el CFA con respecto a su tejido de origen. La SP se distribuye de manera intensa y difusa por todo el CFA y se localiza en el citoplasma y núcleo de las células del CFA. El NK-1R se encuentra de manera estadísticamente significativa más expresada en la reacción glial peritumoral que en otras regiones del tumor y se localiza en la membrana de las células y en los núcleos de las células inflamatorias.

**Discusión:** La necesidad de desarrollar tratamientos médicos efectivos y a la vez que minimicen la morbilidad asociada al tratamiento convencional del CFA hacen de los antagonistas de NK-1R un interesante campo de investigación clínico debido a que el sistema SP /NK-1R puede ser un potenciador del efecto SASP en el CFA.

**Conclusiones:** Estos resultados sugieren que el NK-1R podría ser una nueva diana terapéutica para el tratamiento del CFA y el uso de antagonistas de NK-1R podría servir como una nueva estrategia terapéutica contra el CFA.

**Palabras clave:** Sustancia P, Receptor de Neurokinina-1, Craneofaringioma Adamantinomatoso

## Índice de Títulos

<b>1. Introducción</b> .....	19
1.1 Generalidades del CFA .....	19
1.1.1 Anatomía .....	20
1.1.2 Histología .....	21
1.1.3 Epidemiología .....	23
1.1.4 Presentación Clínica .....	24
1.1.5 Presentación Radiológica .....	25
1.1.6 Enfoque Terapéutico del CFA .....	26
1.1.7 Complicaciones Agudas .....	31
1.1.8 Secuelas a Largo Plazo .....	32
1.1.9 Nuevas Terapias en el CFA .....	34
1.2 Contexto Molecular del CFA .....	35
1.2.1 La Vía WNT en el CFA .....	35
1.2.2 El Microambiente Tumoral en el CFA .....	36
1.2.3 Fenotipo Secretor Asociado a Senescencia en el CFA .....	39
1.2.4 Modelo Oncogénico Paracrino en el CFA .....	42
1.3 La SP y el NK-1R .....	43
1.3.1 Generalidades de la SP y el NK-1R .....	44
1.3.2 Fisiopatología de la SP y el NK-1R .....	45
1.3.3 La SP y el NK-1R y su implicación en el cáncer .....	46
<b>2. Justificación, Pertinencia y Objetivos</b> .....	53
<b>3. Material y Método</b> .....	56
3.1 Diseño del Estudio .....	56

3.2 Población .....	56
3.3 Criterios de Inclusión y Exclusión .....	57
3.4 Análisis Histológico .....	57
3.5 Análisis Estadístico y Recogida de Datos .....	60
3.6 Consideraciones Éticas .....	60
3.7 Cronograma .....	61
<b>4. Resultados .....</b>	<b>62</b>
<b>5. Discusión .....</b>	<b>81</b>
<b>6. Aplicaciones y Perspectivas Futuras .....</b>	<b>93</b>
<b>7. Conclusiones .....</b>	<b>95</b>
<b>8. Bibliografía .....</b>	<b>97</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> Corte sagital de cráneo sobre cadáver.....	21
<b>Figura 2:</b> Corte microscópico con hematoxilina y eosina de CFA .....	22
<b>Figura 3:</b> Inmunolocalización a Beta-catenina en el CFA .....	23
<b>Figura 4:</b> Imagen Radiológica de CFA .....	26
<b>Figura 5:</b> Frecuencia de Activación en vía WNT en CC con respecto a otras regiones del CFA .....	41
<b>Figura 6:</b> Modelo de señalización intracelular accionado por la SP tras unión a NK-1R .....	48
<b>Figura 7:</b> Representación de las isoformas de NK-1R .....	51
<b>Figura 8:</b> Modelo de expansión mutacional y modelo SASP .....	54
<b>Figura 9:</b> Inmunorreactividad a SP en adenohipófisis 10X .....	65
<b>Figura 9a:</b> Inmunorreactividad a SP en adenohipófisis 40X .....	66
<b>Figura 10:</b> Inmunorreactividad a SP en CFA 10X .....	67
<b>Figura 10a:</b> Inmunorreactividad a SP en CFA 20X .....	67
<b>Figura 11:</b> Inmunorreactividad a SP en adenohipófisis 10X y CFA 10X .....	68
<b>Figura 12:</b> Inmunorreactividad a SP en CFA 20X .....	69
<b>Figura 12a:</b> Inmunorreactividad a SP en CFA 40X .....	69
<b>Figura 13:</b> Inmunorreactividad a SP en CFA 40X .....	70
<b>Figura 14:</b> Inmunorreactividad a SP en CFA 15X .....	70
<b>Figura 15:</b> Inmunorreactividad a NK-1R en adenohipófisis 10X .....	71
<b>Figura 16:</b> Inmunorreactividad a NK-1R en CFA 10X .....	72
<b>Figura 16a:</b> Inmunorreactividad a NK-1R en CFA 20X .....	73
<b>Figura 17:</b> Inmunorreactividad a NK-1R en adenohipófisis 10X y CFA 10X .....	74
<b>Figura 18:</b> Inmunorreactividad a NK-1R en CFA 20X .....	74



<b>Figura 19:</b> Inmunorreactividad a NK-1R en CFA 40X .....	75
<b>Figura 20:</b> Inmunorreactividad a NK-1R en CFA 40X .....	75
<b>Figura 21:</b> Inmunorreactividad a NK-1R en CFA 30X .....	76
<b>Figura 22:</b> Inmunorreactividad a NK-1R en CFA 15X .....	77
<b>Figura 23:</b> Inmunorreactividad a NK-1R en CFA 20X .....	78
<b>Figura 24:</b> Inmunorreactividad a NK-1R en CFA 40X .....	78
<b>Figura 25:</b> Control negativo para SP de CFA .....	79
<b>Figura 26:</b> Control negativo para NK-1R de CFA .....	79
<b>Figura 27:</b> Procesos oncológicos involucrados en el mantenimiento y progresión del cáncer.....	82
<b>Figura 28:</b> Modelo oncogénico dirigido por la SP en el CFA .....	84
<b>Figura 29:</b> Efecto de la activación del NK-1R por la SP y su relación con las principales vías de desarrollo oncogénico .....	93



# 1. Introducción

## 1.1 Generalidades del CFA

El Craneofaringioma Adamantinomatoso (CFA) es un tumor que se desarrolla a lo largo del vestigio embrionario que supone la bolsa de Rathke entre el diencéfalo y la nasofaringe<sup>(1)</sup>. A pesar de su carácter benigno conserva gran agresividad local afectando a regiones anatómicas sensibles que se ubican cercanas a donde asienta el tumor. Es el caso del quiasma óptico o del eje hipotálamo-hipofisario, condicionando unas graves secuelas visuales a modo de escotomas o endocrinológicas desarrollando déficit de crecimiento, obesidad hipotalámica, hipotiroidismo, diabetes insípida (DI) o hipocortisolismo entre otros problemas homeostáticos<sup>(2)</sup>.

A pesar del gran desarrollo en cuanto a tratamientos que han experimentado diversos tipos de cáncer, poco se ha avanzado en las terapias del CFA desde su descubrimiento hace más de 165 años por parte de Friederich Albert Von Zenker<sup>(3)</sup>. Actualmente la cirugía y la radioterapia (RT) continúan siendo los tratamientos estándar de esta patología a pesar de la alta tasa de recidiva tras dichos procedimientos y de las secuelas que desencadenan y que a menudo ocasionan una muerte precoz y muchos años de calidad de vida disminuida en los pacientes, que en su mayoría se tratan de niños<sup>(4)</sup>.

Debido a la comentada dificultad en su manejo, el desarrollo de nuevas terapias para el CFA supone un importante avance para mejorar la tasa de curación y disminuir las secuelas que sufren los pacientes<sup>(5)</sup>. En este contexto, el campo de investigación que supone la Sustancia P (SP) y el receptor de Neurokinina 1 (NK-1R) y su bloqueo a partir de antagonistas puede abrir las puertas al desarrollo de medicamentos con actividad terapéutica para el CFA<sup>(6)</sup>.

### 1.1.1 Anatomía

El CFA se desarrolla en los centros ectodérmicos involutivos de la llamada Bolsa de Rathke o conducto craneofaríngeo, un órgano embrionario en el cual se asientan las células troncales que darán lugar a la hipófisis anterior tras sufrir un proceso de maduración y migración<sup>(7)</sup>.

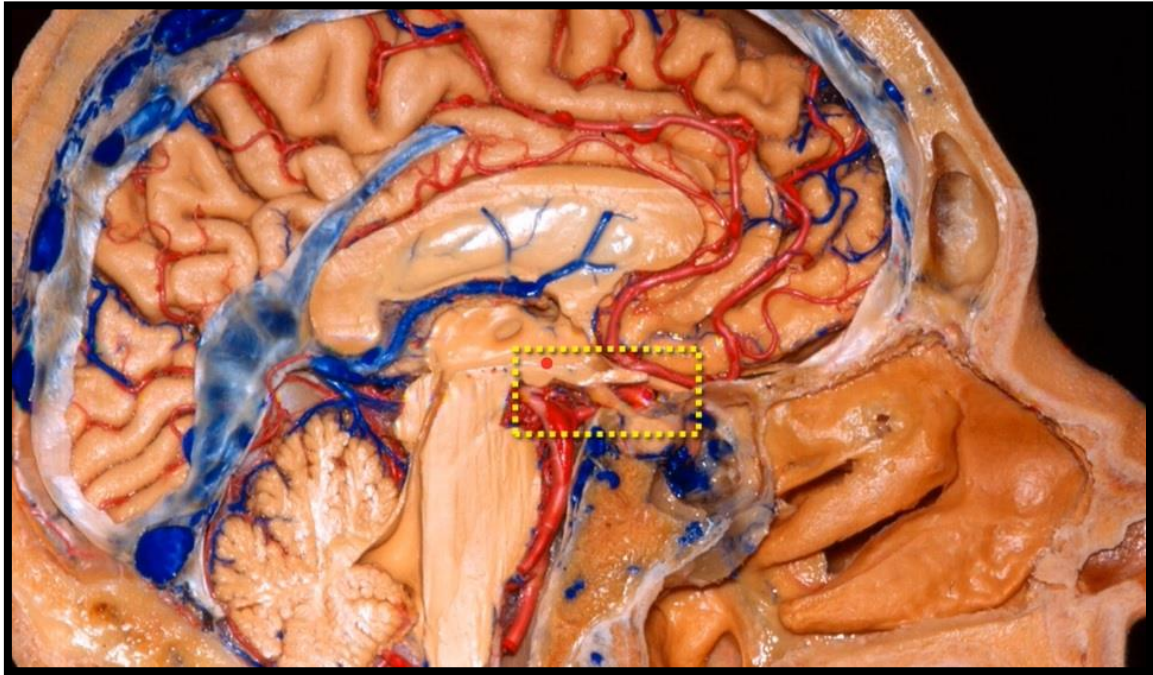
Son tumores heterogéneos con componentes sólidos y multiquísticos, a menudo siendo los quistes de gran tamaño. Asientan en la base del cráneo donde agrandan y erosionan la silla turca y sufren una inicial extensión hacia región supraselar aunque con frecuencia pueden ubicarse en zonas paraselares. Crecen sobre todo a partir de sus componentes quísticos y siguen un trayecto ascendente hacia el suelo del tercer ventrículo alojándose entre los cuerpos mamilares y contactando durante su crecimiento con el *tuber cinereum* y los núcleos posteriores del hipotálamo a los que llegan a desplazar y destruir<sup>(8)</sup>.

Anteriormente se hallan el quiasma óptico, el seno cavernoso, las arterias carótidas internas y la hipófisis. Durante su crecimiento suelen presionar y desplazar anteriormente el tallo hipofisario y con frecuencia hacen descender y adelantar al quiasma óptico.

Posteriormente se encuentra el pedúnculo cerebral y el puente y a los laterales se sitúan los cuerpos mamilares, los tractos ópticos, y los fascículos mamilotalámicos.

Durante su crecimiento pueden causar hidrocefalia al presionar el mesencéfalo y producir la oclusión del Acueducto de Silvio o colapsar el Tercer Ventrículo mediante presión ejercida sobre su suelo<sup>(8)</sup>.

En la **figura 1** se muestra corte sagital sobre cadáver con la región anatómica donde se desarrolla el CFA encuadrada por líneas amarillas. Obsérvese la comentada cercanía al tallo hipofisario, las vías ópticas y el hipotálamo.



**Figura 1: Corte sagital de cráneo sobre cadáver.** Tomado de *The Neurosurgical Atlas*.  
Copyright © 2022 Neurosurgical Atlas, Inc. Aaron Cohen-Gadol

### 1.1.2 Histología

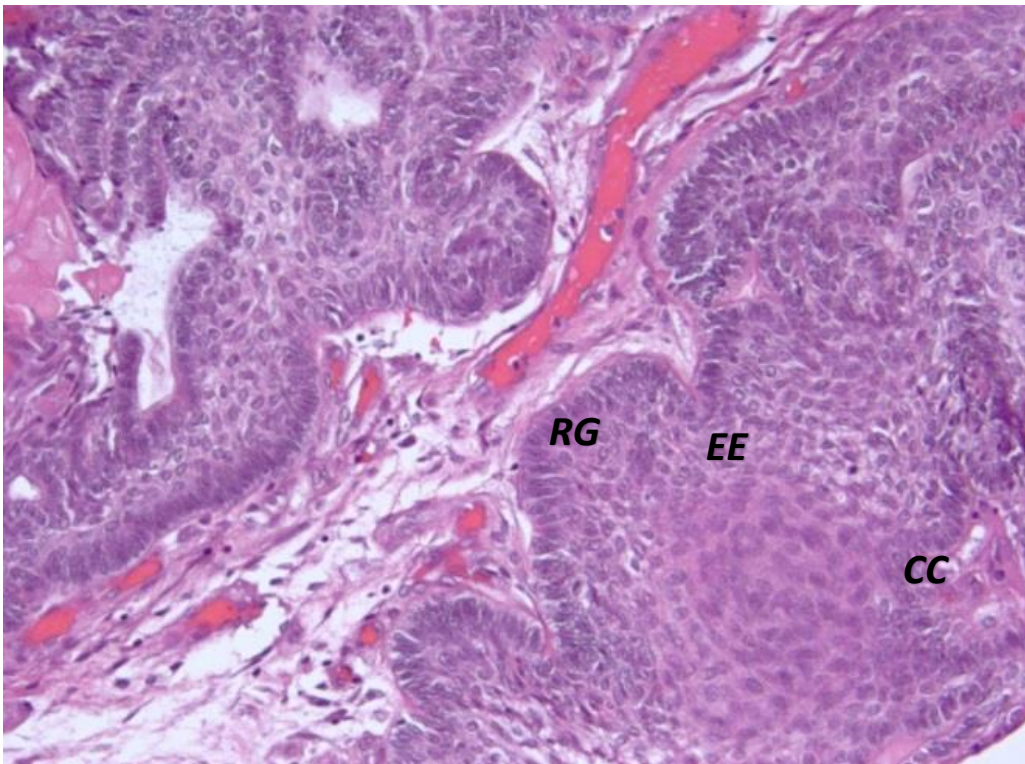
Existen dos subtipos de Craneofaringioma<sup>(7)</sup>, el subtipo papilar, más infrecuente y el subtipo adamantinomatoso, más extendido y el cual se aborda en la tesis.

Son tumores considerados de bajo riesgo histológico (grado I de la WHO)<sup>(9)</sup>. El CFA se trata de un tumor heterogéneo compuesto por regiones celulares que se alternan con otras calcificadas y quísticas, ocupadas por cristales de colesterol, suero rico en proteínas y mediadores inflamatorios. Las regiones celulares son claramente diferenciables<sup>(10)</sup>: 1) una capa basal de células pequeñas organizadas en nidos y denominadas *Cluster Cells* (CC) que se encuentran en la base de la siguiente zona que es 2) el epitelio en empalizada (EE) que consiste en áreas de células planas poligonales altamente organizadas y queratinizadas hasta tal punto que pueden presentar nódulos de queratina (*wet-keratin*) o calcificaciones. Esta región supone el frente de avance del tumor a través de unas

prolongaciones en dedo (*finger-like*) rodeadas exteriormente por 3) áreas de Reacción Glial (RG) que corresponde a tejido cerebral sano infiltrado por reacción astrocitaria, fibras de Rosenthal y neovasos que a menudo permiten a los cirujanos conocer el límite de resección quirúrgico.

Con respecto a su constitución inmunohistoquímica muestra positividad para Pancitoqueratina, Citoqueratinas 5/6,7,8 14, Antígeno Epitelial de Membrana (EMA), Beta-catenina nuclear específicamente en las CC y Ki-67 bajo y predominantemente concentrado en el epitelio en empalizada<sup>(10)</sup>.

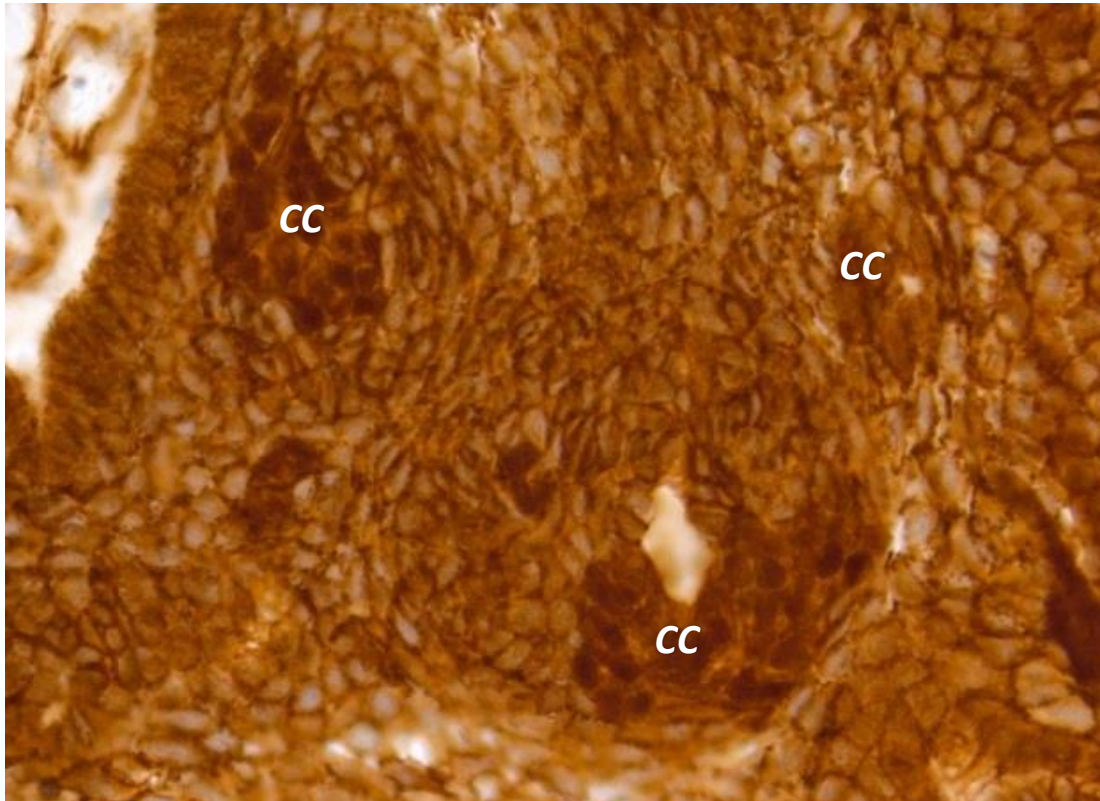
En la **Figura 2** se puede observar un corte histológico teñido con hematoxilina y eosina de las diferentes regiones histológicas que componen el CFA. Señalado con **EE** que son las regiones más proliferativas y en cuya base se encuentran las **CC** a modo de remolino o *whorl*, Con se representa la reacción glial del tumor, compuesto por glía, leucocitos y vasos sanguíneos.



**Figura 2:** Corte microscópico con hematoxilina y eosina de CFA. CC: Cluster Cells, EE: Epitelio en Empalizada, RG: Reacción Glial. Tomado de Pathology Outlines. Copyright © 2003-2022, PathologyOutlines.com, Inc. Angela France, Nelly S. Lakis.



En la **Figura 3** se observa la inmunorreactividad para la Beta-catenina en el CFA. Se detecta una distribución citoplasmática excepto en las **CC** en las cuales se determina la traslocación nuclear de la misma. Obsérvese con detenimiento como solo en este conjunto celular es detectable la expresión nuclear de la Beta-catenina.



**Figura 3: Inmunolocalización a Beta-catenina en el CFA. CC: Cluster Cells.**  
*Tomado de Pathology Outlines. Copyright © 2003-2022, PathologyOutlines.com, Inc. Angela France, Nelly S. Lakis*

### 1.1.3 Epidemiología

El CFA constituyen entre el 1.2 y el 4.6 % del total de los tumores intracraneales y su incidencia es de 0.5 a 2.5 casos anuales por cada millón de habitantes<sup>(2,11)</sup>. Su incidencia no parece ser mayor en ningún grupo étnico en particular, si bien en Japón se ha descrito una mayor incidencia con 3.8 casos anuales por cada millón de habitantes<sup>(12)</sup>.

En cuanto a grupos etarios, entre un 30% y un 50% del grueso de CFA, son diagnosticados en niños y adolescentes, siendo el CFA el tumor intracraneal no neuroepitelial más

frecuente en la edad pediátrica. El CFA supone entre el 5% y el 11% de todas las neoplasias cerebrales pediátricas y es el tumor supraselar más frecuente que se presenta en niños<sup>(13,14)</sup>.

El CFA adquiere una distribución bimodal con un pico etario entre 5 y 15 años y otro entre los 45 y 60 años<sup>(11)</sup>. El CFA es el subtipo de craneofaringioma que se presenta en niños, siendo la variedad papilar prácticamente exclusiva de los adultos<sup>(9)</sup>.

No se encuentra predisposición por razones de sexo ni por exposición a ningún carcinógeno<sup>(11)</sup>. Tampoco parece existir agregación o susceptibilidad genética reconocida, aunque se han descrito familias con varios miembros afectados<sup>(15,16)</sup>. Ningún síndrome de predisposición al cáncer parece relacionarse con el desarrollo de CFA.

#### 1.1.4 Presentación Clínica

Los pacientes afectados de CFA suelen tener una clínica insidiosa con una evolución subaguda o crónica<sup>(17)</sup>. El síntoma que se describe con mayor frecuencia al diagnóstico es la cefalea que se observa en entre un 60-75% de los casos<sup>(18)</sup>.

Al tratarse de un tumor localizado en el eje hipotálamo-hipofisario, los primeros síntomas suelen deberse a trastornos hormonales. El enlentecimiento en la velocidad de crecimiento por bloqueo de la hormona de crecimiento (GH) y la adquisición de una adiposidad y obesidad hipotalámicas suelen ser los primeros problemas que aparecen, adquiriendo los pacientes un característico fenotipo pícnico<sup>(17)</sup>.

Son a menudo los endocrinólogos infantiles o de adultos los que emiten el diagnóstico de sospecha al encontrar déficits hormonales centrales en los estudios analíticos (presentes entre un 54% y un 100% de los pacientes)<sup>(2,18)</sup> con niveles bajos de GH en tres cuartas partes de los pacientes, de hormonas sexuales en casi la mitad de los pacientes y tirotrópina (TSH) o adrenocorticotropina (ACTH) en un cuarto de los pacientes<sup>(2,4,18)</sup>. Se prescribe una resonancia magnética (RM) por esta causa que pone de manifiesto la lesión.

La existencia de una DI central por déficit de hormona antidiurética (ADH) es uno de los escenarios más frecuentes (presente entre el 17% y el 27% de los pacientes al diagnóstico)<sup>(2,5)</sup>. A menudo el paciente arrastra una historia de polidipsia y poliuria de



meses de evolución que a menudo se ha normalizado por la familia y por el propio paciente.

Los problemas visuales son otro orbe de síntomas iniciales (presentes entre el 62% y 84% de los pacientes al diagnóstico)<sup>(18)</sup>, aunque con frecuencia los escotomas visuales avanzan muy lentamente y la gran plasticidad cerebral del niño permite que los déficits sean minimizados y escasamente discapacitantes. Por presión superior sobre el quiasma, la hemianopsia bitemporal con inicio en cuadrantes inferiores suele estar presente hasta en el 49% de los pacientes<sup>(2,18,19)</sup>.

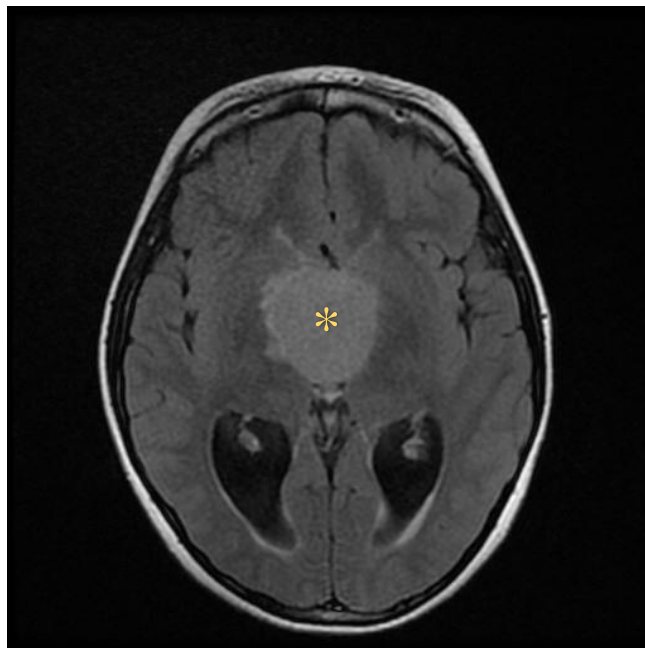
No es infrecuente que muchos casos conlleven un retraso diagnóstico y los pacientes consulten por síntomas de bajo rendimiento escolar, cambios comportamentales y una progresiva hipertensión intracraneal (HTIC) con papiledema, vómitos, ataxia o parálisis oculomotoras<sup>(17)</sup>. Todo este cuadro se ve agudizado si se desarrolla una hidrocefalia aguda al colapsarse el tercer ventrículo o cerrarse el acueducto de Silvio con el crecimiento progresivo del tumor<sup>(17,20)</sup>. Este hecho arrastra normalmente a los pacientes a las unidades de cuidados intensivos y con frecuencia requieren la inserción de drenajes ventriculares externos (DVE) o implantación de una válvula de derivación ventricular (VDV)<sup>(18)</sup>.

En adultos la pérdida de la libido y los problemas neuropsiquiátricos han sido reconocidos con relativa frecuencia<sup>(2)</sup>.

### 1.1.5 Presentación Radiológica

El CFA se trata de un tumor heterogéneo, elíptico y multilobulado que se asienta en la región supraselar y en la línea media diencefálica, experimentando un crecimiento invasivo hacia el tercer ventrículo, distorsivo del tallo hipofisario y del quiasma óptico y compresivo de los tubérculos mamilares y del hipotálamo<sup>(2,8)</sup>. Presenta quistes tumorales que pueden alcanzar un tamaño gigantesco y que se alternan con regiones sólidas poco extensas y con calcificaciones. La técnica de imagen que habitualmente se aplica es la RM por la ausencia de radiación y el hecho de tratarse habitualmente de pacientes en edad pediátrica. Los quistes se comportan hipointensos en T1 e hiperintensos en T2 por norma general, mostrando una intensidad mayor a la del líquido cefalorraquídeo (LCR). Las regiones sólidas del tumor se comportan de manera iso o hipointensas en T1 y de modo variable en T2. Con la administración de contraste existe una captación por parte de la

región sólida y de la pared de los quistes. La alternancia de regiones hipo e hiperintensas es una característica asociada a la heterogeneidad del craneofaringioma y se determina por la presencia de calcificaciones en el tejido, que a menudo son difíciles de discernir incluso en T2 que es la secuencia más apropiada para ello. Cuando se administra contraste, los quistes muestran isointensidad y refuerzo en su pared<sup>(21,22)</sup>. La valoración a menudo se encuentra dificultada por la presencia de aire en los senos etmoidales. La Tomografía Computerizada (TC) se ha demostrado más sensible para la detección de las calcificaciones mediante pruebas de imagen<sup>(23)</sup>.



**Figura 4. Imagen Radiológica de CFA.** Se muestra RM con secuencia T1. Obsérvese el tumor (\*) con su clásico crecimiento en la línea media y cómo, asentándose en la región infratalámica se expande e invade el diencefalo.

Habitualmente la lesión es única, pero se han descrito casos de diseminación leptomenígea, habitualmente secundaria a la agresión quirúrgica<sup>(24)</sup>.

Los diagnósticos diferenciales radiológicos son con otros tumores propio de dichas edades pediátricas que se asientan en la línea media: específicamente los gliomas de bajo grado pediátricos (pLGG) y los tumores de células germinales (GCT) cuyos picos de incidencia se encuentran solapados con los del CFA<sup>(2,18)</sup>.

Los pLGG son tumores principalmente sólidos, aunque pueden presentar quistes como en los CFA. En T2 se muestran hiperintensos y suelen asociar una difusión aumentada. Un dato interesante es que incluso los pLGG muy cercanos a la hipófisis, respetan su morfología e hiperintensidad en T1 en su región posterior a diferencia de los CFA que suelen desplazar y comprometer su tallo<sup>(25)</sup>.

Los GCT sobre todo en sus variantes secretoras, se parecen altamente al CFA en la presencia de quistes y en el comportamiento mixto del tejido con la secuencia T2. Con respecto a la hipófisis y al igual que el CFA, se asocia con una hipófisis atrofiada<sup>(25)</sup>.

El CFA requiere también valorar diagnósticos diferenciales con lesiones benignas como el quiste en la bolsa de Rathke o el Xantogranuloma. Ambas son lesiones indistinguibles de CFA mayormente quísticos y de pequeño tamaño<sup>(26)</sup>.

### 1.1.6 Enfoque Terapéutico Del CFA

Los avances en el campo radiológico, el desarrollo de la antibioterapia, corticoterapia y los tratamientos intensivos en el postoperatorio quirúrgico junto con el salto de calidad que ha experimentado la radioterapia en las últimas décadas, han permitido una mejoría en los resultados del tratamiento oncológico del craneofaringioma pero como demostraron los estudios prospectivos KRANIOPHARYNGEOM 2000<sup>(27)</sup> y 2007<sup>(28)</sup> determinaron la necesidad de priorizar la calidad de vida de los pacientes con respecto al control de la enfermedad. Así el mejor tratamiento que puede ofrecerse hoy en día a los enfermos de CFA es aquel que ofrezca una mejor calidad de vida con una menor morbilidad a largo plazo ya que la mortalidad por parte del tumor es baja siempre y cuando se consiga el control local<sup>(2,4,8,18,19)</sup>.

El control de la enfermedad a largo plazo ha sido descrito con un éxito variable con supervivencia libre de eventos a largo plazo de entre 44% al 93%<sup>(11)</sup>. La resección amplia ha sido reconocido como un factor esencial para minimizar el riesgo de recaídas ya que entre el 70-94% de los pacientes con una resección incompleta sufren una recaída<sup>(2,4,18)</sup>. Sin embargo, la resección amplia se asocia con mayores secuelas a nivel hipotalámico<sup>(2,4,8,11,18)</sup>.

En cuanto al beneficio sintomático asociado a la cirugía es muy importante desapareciendo los signos de HTIC con inmediatez y mejorando la sintomatología visual

a corto plazo en un 75-100% de los pacientes<sup>(2,5)</sup>. Los resultados en población infantil parecen ser más pobres y persisten alteraciones visuales postoperatorias entre el 48-75% de los pacientes<sup>(18,19)</sup>.

Evitar el daño hipotalámico irreversible es un aspecto esencial en la cirugía<sup>(2,4,29)</sup>. El compromiso del hipotálamo al diagnóstico se correlaciona con el desarrollo postquirúrgico de obesidad y adiposidad, igualmente las cirugías agresivas, se asocian con dichas secuelas<sup>(5,18,30,31)</sup>. Se ha demostrado que la calidad de vida de los pacientes se asocia inversamente a la extensión de la resección<sup>(28,31)</sup>.

Es por ello que el estudio radiológico preoperatorio es sumamente importante en el manejo del CFA<sup>(8,32)</sup>. Teniendo en cuenta que los núcleos posteriores del hipotálamo se encuentran en las paredes laterales del Tercer Ventrículo, el compromiso sobre el hipotálamo se ha instaurado como un marcador pronóstico para intentar realizar la resección quirúrgica lo más completa posible preservando la funcionalidad y se han establecido clasificaciones<sup>(17,33,34)</sup>: el tumor no contacta con el suelo del tercer ventrículo (H0), contacta o comprime el hipotálamo en la sección anterior a los tubérculos mamilares (H1) o contacta, desplaza o destruye el hipotálamo a nivel de los tubérculos mamilares o los sobrepasa dorsalmente (H2). En los estadios H2 no se recomienda la resección completa y se prefiere la subtotal debido a que una resección tipo extensa (GTR) puede causar una morbilidad endocrinológica o visual importante<sup>(4,5,19)</sup>.

Grado H0: no existe contacto con el hipotálamo. En los pacientes adultos se suele considerar un abordaje endoscópico transesfenoidal. En niños este abordaje quirúrgico está menos extendido y requiere de cirujanos expertos, al ser los límites anatómicos más frágiles y difusos, pueden ocasionarse fístulas de LCR o daño vascular. Las técnicas de neuronavegación y las técnicas de colgajos nasoseptales pueden minimizar estos problemas<sup>(35,36)</sup>.

Grado H1: el tumor presiona el hipotálamo. Habitualmente requiere una cirugía transcraneal y la resección GTR es posible si existe un límite de disección con respecto al suelo del tercer ventrículo y el neurocirujano tiene experiencia con respecto a esta cirugía<sup>(35,36)</sup>.

Grado H2: el tumor invade el hipotálamo y no permite discernir márgenes radiológicos. La mayoría de los CFA se presentan en este estadio (entre un 40-70% según series). Las rutas de abordajes intracraneales incluyen la transcallosa, transfrontal, subfrontal o

pterional. La cirugía es altamente sensible y arriesgada por lo que cirugías en varios pasos suelen ser recomendables para conseguir la resección más completa posible junto a minimizar el daño ejercido sobre el hipotálamo. Si se realizan varias operaciones, es importante prever el efecto de la primera sobre la circulación del LCR y el desplazamiento del tumor con respecto a las áreas sensibles<sup>(37,38)</sup>.

El tratamiento quirúrgico gradado según el compromiso hipotalámico se está imponiendo como un mecanismo de protección eficaz para evitar las secuelas hipotalámicas tras la agresión quirúrgica<sup>(4,19)</sup>.

En cuanto al manejo quirúrgico no existe ninguna recomendación general siendo muy recomendable la individualización de cada caso y el no ser demasiado agresivo con el acto quirúrgico<sup>(2,27-29)</sup>. A pesar de que las resecciones amplias se asocian a menor tasa de recurrencias<sup>(31)</sup>, no parecen existir diferencias en términos de supervivencia global o supervivencia libre de progresión a los 5 o 10 años entre los pacientes que han recibido una resección completa con respecto a aquéllos que reciben una subtotal junto a adyuvancia por parte habitualmente de RT que supone el tratamiento adyuvante estándar<sup>(39)</sup>.

En resumen: es preferible realizar una resección lo más completa posible, siempre y cuando sea segura dicha cirugía. Si el acto quirúrgico parece complejo, las cirugías por fases son una opción razonable, drenando de la manera menos agresiva los quistes de mayor tamaño, priorizando la circulación del LCR o la disminución de los síntomas de HTIC a la par que ir resecando las regiones más accesibles y completando con el uso de la RT o la protonterapia las áreas más dificultosas<sup>(2,4)</sup>. La planificación neurorradiológica previa a la intervención quirúrgica es vital ya que se requiere conocer la relación del tumor con las estructuras vasculares, hipofisarias o visuales para evitar daños irreversibles. En las cirugías de CFA, incluso conservando el tallo hipofisario, en un 50% de los escenarios postquirúrgicos, se desarrolla una DI<sup>(31)</sup>. Si realmente se daña el tallo hipofisario, el desarrollo de la DI es seguro. Es importante la localización radiológica previa a la cirugía de la arteria comunicante anterior, así como la delimitación del quiasma óptico, del septum pellucidum como separación de las astas anteriores de los ventrículos laterales y de los cuerpos mamilares como límite de localización del hipotálamo<sup>(2,4)</sup>.

Debido a la elevada proporción de morbilidades asociadas a la cirugía y a la tendencia a la recurrencia local que experimenta el CFA, progresivamente se intenta limitar la

agresividad del proceso quirúrgico y primar la preservación de estructuras cerebrales, postergando nuevas intervenciones o la adyuvancia a los requerimientos del propio paciente según progrese clínicamente su enfermedad<sup>(11,27-29)</sup>. Esto es algo sumamente complejo y en el que no existe un consenso a nivel internacional, existiendo amplias diferencias en el modo de manejar esta enfermedad y en el que cuentan diversos factores para el modo de proceder: la pericia o criterio por parte de neurocirugía, la experiencia de los oncólogos médicos, las decisiones del comité de tumores, el grado de ansiedad familiar o sus preferencias, la repercusión clínica del tumor y su localización<sup>(40)</sup>.

Para minimizar la agresión asociada a la cirugía, se han desarrollado una serie de estrategias quirúrgicas como son las terapias intraquísticas que pueden suponer una alternativa en aquellos pacientes con grandes quistes únicos que son los que causan la sintomatología de HTIC. El vaciamiento del quiste puede retrasar una cirugía que se plantea arriesgada o permite postergar la radioterapia en pacientes de corta edad. El sistema consiste en vaciar el contenido quístico para aliviar la presión intracraneal<sup>(2,4,41)</sup>. Ocasionalmente se ha intentado administrar con escaso efecto alguna sustancia que evitase el relleno nuevamente del quiste como Interferón- $\alpha$  (IFN-  $\alpha$ ) o Bleomicina<sup>(42,43)</sup>.

La RT ya sea usando fotones o más recientemente protones es un recurso a considerar en la lucha contra el CFA de un modo adyuvante a una cirugía tipo GTR o en cirugías subtotales tras la recuperación del acto quirúrgico o en el momento de la progresión<sup>(2,4)</sup>. Las diferentes estrategias parecen tener un resultado similar y ser eficaces con una supervivencia global a los 10 años superior al 90%, según los datos del US Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) data<sup>(11)</sup>. La administración de RT ha demostrado disminuir la tasa de recurrencia del tumor en cirugías tipo subtotal desde un 55-85% a un 0-20% y mostrar supervivencia libre de eventos a 10 años de entre 77-100%, resultados similares a los obtenidos con cirugías tipo amplias<sup>(18,39,40)</sup>.

Conociendo que la cantidad de tumor residual no influye en la tasa de control local tras la RT<sup>(5)</sup> y que las secuelas a largo plazo se han demostrado como un hándicap importante en el manejo del CFA<sup>(18)</sup>, las estrategias que combinan una resección parcial eliminando la masa tumoral sintomática en términos de compromiso visual o de HTIC junto con la posterior irradiación de una menor masa tumoral y de zonas menos próximas a regiones sensibles no resecaadas, parece un manejo apropiado del tumor que evita la aparición de daño hipotalámico que condicione adiposidad hipotalámica o DI<sup>(29,44)</sup>.

Las técnicas modernas de RT, como la radiocirugía estereotáctica, han conseguido una escalada de dosis más efectiva que permite la administración más circunscrita de la RT al tumor y minimización de la radiación sobre tejidos sanos. El uso de la protonterapia ha supuesto una revolución en la forma de administrar RT a pacientes con tumores localizados en una zona tan sensible y a una edad tan temprana como la típica de los pacientes afectados de CFA. Esto se debe a una más abrupta liberación de energía en el tejido, minimizando la cola de salida del haz de radiación y de este modo evitando el daño a tejidos sanos<sup>(45)</sup>.

### 1.1.7 Complicaciones Agudas

Con frecuencia la presentación del CFA es a través de signos de HTIC rápidamente progresivos que se desencadenan de manera aguda debido a una hidrocefalia biventricular de rápida instauración al ocluir el tumor el tercer ventrículo<sup>(20)</sup>. El desarrollo de esta complicación requiere un tratamiento quirúrgico urgente que progresivamente se está abordando mediante técnicas endoscópicas<sup>(46)</sup>. Debido a que la semiología de HTIC la condicionan habitualmente las regiones quísticas del tumor, un vaciamiento guiado radiológicamente o por endoscopia dejando un catéter emplazado intraquícticamente permite realizar de manera segura y eficaz el tratamiento etiológico de la HTIC disminuyendo el riesgo de daño neuroendocrinológico. Posteriormente la inserción de un reservorio Ommaya permitiría actuar nuevamente sobre el quiste facilitando la técnica<sup>(5)</sup>. Se ha de evitar dentro de lo posible la implantación de VDV por la morbilidad que generarían en los pacientes afectados de CFA que con posterioridad sufrirán nuevas intervenciones terapéuticas<sup>(2,4)</sup>.

Con respecto a la pérdida campimétrica sufrida por los pacientes, ésta suele desarrollarse por compresión por parte de la región sólida del tumor y es la intervención quirúrgica abierta la única técnica que se considera en este contexto para garantizarse una mayor recuperación visual en el contexto de complejidad anatómica y potencial discapacidad<sup>(37)</sup>.

Existen muchos potenciales problemas asociados a la intervención quirúrgica como son las infecciones asociadas a la cirugía, el daño vascular debido a que la región está ricamente irrigada en cercanía del polígono de Willis o del plexo hipofisario y la

precipitación de la claudicación endocrinológica, especialmente de una DI en el postoperatorio<sup>(18)</sup>.

En este punto hay que prestar atención a los trastornos en la homeostasis del sodio. En el período postoperatorio inmediato es posible el desarrollo inicial de una secreción inadecuada de hormona antidiurética (SIADH) con su característica apatía progresiva, oliguria, náuseas, bradipsiquia y cuando se alcanza unos niveles de sodio suficientemente bajos sufren crisis comiciales o incluso coma. El fenómeno de Síndrome Pierde Sal, es también frecuente con su poliuria natriurética y adquisición de una deshidratación hiponatémica que puede hacernos confundir con la aparición de la esperada DI<sup>(27)</sup>. Con el paso de los días se instaura esta última patología con gran frecuencia y permanece vinculada al paciente para el resto de su vida condicionando una alta morbilidad. Debido a los trastornos natriuréticos asociados al postoperatorio: la vigilancia en cuidados intensivos hasta días después del hecho quirúrgico parece una condición *sine qua non*<sup>(17,18,27)</sup>.

La RT también puede presentar una serie de complicaciones a corto plazo, puede agravar sintomatología neurológica durante o semanas posteriores a la administración de RT, agravar los déficits endocrinológicos o generar complicaciones infecciosas fruto de la sedación diaria que se requiere para la inmovilización de ciertos pacientes.

### 1.1.8 Secuelas y toxicidades a largo plazo

A pesar de la progresiva sensibilización en la preservación de la función hipotalámica en las cirugías de los CFA. La disfunción del hipotálamo continúa siendo frecuente y sus secuelas persisten de manera irreversible<sup>(4,18)</sup>.

Existen secuelas que se desarrollan a largo plazo y necesitan de un tiempo de latencia largo, con un seguimiento médico prolongado y un grado de suspicacia elevado por parte de la familia, como es el caso de las secuelas vasculares o endocrinológicas secundarias a la radioterapia o a las cirugías efectuadas en el tumor.

La tasa de obesidad hipotalámica se corresponde con el grado de daño hipotalámico y su repercusión en el día a día es llamativa, hecho demostrado por encuestas de calidad de vida<sup>(30)</sup>. Es una temida complicación asociada a la progresión del CFA o secundaria a la agresión quirúrgica. Es debida a la alteración en los centros hipotalámicos reguladores de



la termorregulación, la saciedad, el sueño, el gasto calórico y el influjo simpático; los pacientes suelen tener una predominancia parasimpática con la disminución de los ratios metabólicos y la adquisición de una obesidad con frecuencia mórbida y un fenotipo pícnico y adiposo que no responde a medidas higiénico-dietéticas<sup>(2,27)</sup>.

Se ha intentado hacer frente a este problema de la obesidad hipotalámica desde el punto de vista farmacológico con fármacos neuroestimulantes, oxitocina, sensibilizantes a la insulina con un escaso efecto terapéutico. Incluso la cirugía bariátrica ha presentado resultados poco alentadores. Es por ende, que evitar el daño hipotalámico y la obesidad derivada del mismo como uno de los pilares claves a considerar en el tratamiento del CFA<sup>(2)</sup>.

La RT no está exenta de toxicidades a largo plazo y los problemas vasculodegenerativos, memorísticos o endocrinológicos pueden desarrollarse con el paso de los meses o años. Aun no existen trabajos que demuestren una menor tasa de vasculopatía o déficit neurológicos en los pacientes tratados con protonterapia aunque el resultado en términos de rendimiento intelectual parece positivo<sup>(47)</sup>.

Las escalas de calidad de vida no están validadas particularmente para el CFA, pero el mantener una independencia social y funcional completa es el objetivo primordial del tratamiento del CFA<sup>(8,30)</sup>. En el KRANIOPHARYNGEOM 2007 se demostró que los pacientes con resecciones amplias y por ende, con daño hipotalámico, presentaban mayores discapacidades físicas, de imagen corporal, funcionales, sociales y emocionales<sup>(29)</sup>.

La mayoría de las secuelas requieren medicaciones crónicas para el resto de la vida como son las terapias sustitutivas del hipotiroidismo, el hipocortisolismo o la DI centrales. Otras complicaciones por desgracia son igual de crónicas pero no cuentan con tratamientos farmacológicos efectivos como la alteración de los ritmos sueño-vigilia, los problemas de aprendizaje o el déficit de atención<sup>(11)</sup>.

Los problemas neuropsicológicos de los pacientes afectados por CFA están bien reconocidos y a menudo son incapacitantes para llevar una vida productiva debido a alteraciones afectivas, comportamentales, emocionales o educacionales que los pacientes reconocen como más graves que su propia salud física. Los problemas neuropsicológicos pueden generar repercusión laboral y escolar muy importante, son habituales trastorno de memoria, de atención, bradipsiquia y de la función ejecutiva. Estos problemas tienen

cabida dentro del daño hipotalámico que se puede desarrollar secundario al tumor o a sus tratamientos. Para estas secuelas, solo la rehabilitación neuropsicológica parece ayudar a mejorarlas, sin embargo la prevención del daño hipotalámico es la mejor manera de minimizarlo<sup>(48-50)</sup>.

Las complicaciones endocrinológicas se han reportado encontrarse entre el 54-100% de los pacientes y corresponden a déficit de ACTH, GH, TSH o DI. Las complicaciones derivadas de estos déficits como la talla baja o las crisis adrenales son frecuentes en los pacientes afectados de CFA. Estos pacientes requieren tratamientos hormonales sustitutivos de por vida<sup>(2,4,18,27)</sup>.

### 1.1.9 Nuevas Terapias en el CFA

Conociendo las toxicidades derivadas de los tratamientos convencionales del CFA (cirugía y RT) y su alta tasa de fracasos en términos de recurrencia, el desarrollo de nuevas terapias eficaces se impone como un campo de desarrollo esencial. Se ha experimentado con la aplicación con escaso éxito de moléculas inhibitoras de vías oncogénicas como los inhibidores de la vía Sonic Hedgehog (SHH)<sup>(51)</sup> o limitar el microambiente inflamatorio asociado al CFA mediante infusiones intraquísticas de IFN- $\alpha$ <sup>(42)</sup> o tratamiento sistémico con inhibidores de IL-6, este último con resultados alentadores<sup>(52)</sup>. Con respecto a la variedad papilar del craneofaringioma, la mutación *driver* de la patología ha demostrado ser la BRAF V600E y los bloqueantes de esta proteína junto con otros inhibidores de la vía MAPK, han demostrado ser de especial interés<sup>(53)</sup>.

Con respecto a inhibidores selectivos de la vía Wingless (WNT), la línea de activación conductora en el CFA, se encuentran en una vía de desarrollo muy inicial y están apareciendo inhibidores de la proteína Porcupina, involucrada en la externalización de ligando Wnt al espacio extracelular<sup>(54)</sup>.

## 1.2 Contexto molecular del CFA

Conociendo la cada vez más importante personalización de la oncología y de la creciente implementación de las terapias dirigidas en diversos tumores, el conocimiento de la biología molecular del CFA supone un hito necesario para evitar la morbilidad asociada a los tratamientos oncológicos no discriminativos (en este caso la cirugía y la RT).

Secuenciación de gran número de piezas tumorales, han demostrado que la mutación exclusiva y característica del CFA es la del exón 3 del gen CTNNB1. Se ha demostrado su presencia en el 94-96% de los casos y condiciona una translocación nuclear de Beta-catenina con secundaria hiperactivación de la vía WNT con las correspondientes señales mitogénicas e invasivas. Por el contrario, no se han encontrado otras mutaciones oncogénicas en las piezas tumorales de CFA<sup>(55,56)</sup>.

### 1.2.1 La vía WNT en el CFA

La vía WNT supone una vía de señalización celular esencial para el comportamiento, migración y proliferación de las células troncales y por consiguiente es un elemento esencial en el proceso de la embriogénesis<sup>(57)</sup>.

La proteína Beta-catenina es el elemento central en esta cascada de señalización. Se trata de una proteína membranocitoplasmática con funciones transcriptoras y de unión intracelular tipo adherens y que al translocarse al núcleo produce la activación de los factores de transcripción T-Cell Factor (TCF) y Lymphoid Enhancer Factor (LEF) con efecto sobre oncogenes que exacerban el ciclo celular como la Ciclina D1 o c-myc<sup>(57)</sup>. Este complejo sistema de señalización cumple funciones esenciales en la embriogénesis como se ha comentado.

El ligando Wnt es el señalizador extracelular preferente de la vía que lleva su nombre. En ausencia de éste, la vía está inactiva y la Beta-catenina se encuentra fosforilada por el complejo proteico formado entre glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3B) y el complejo anaphase-promoting complex (APC) promoviendo la degradación de la Beta-catenina y evitando su traslocación al núcleo celular<sup>(57)</sup>.

Cuando el ligando extracelular Wnt se acopla a su receptor extracelular Frizzled (Fz), se produce la activación canónica de la vía Wnt y se consigue la inactivación del complejo

GSK3B/APC a través de la proteína Dishevered (DSH), produciéndose la traslocación nuclear de la proteína membranocitoplásmica Beta-catenina y la consiguiente puesta en marcha de los acontecimientos mitogénicos<sup>(57)</sup>.

La desregulación de la vía WNT, conduce a la proliferación descontrolada y supone un evento oncogénico reconocido como *driver* o conductor en diferentes cánceres como hepatocarcinoma, cáncer colorrectal o meduloblastoma<sup>(57)</sup>.

Precisamente en el CFA la única alteración molecular oncogénica detectada en secuenciaciones de gran número de tumores es una ganancia de función en el exón 3 de CTNNB1, gen que codifica la Beta-catenina, produciendo una resistencia a la fosforilación y otorgando resistencia a la Beta-catenina para la degradación y permitiéndole acumularse en el núcleo celular con la consiguiente activación constitucional y la proliferación descontrolada. Éste es el mecanismo orquestal que caracteriza al CFA<sup>(56)</sup>.

La detección de Beta-catenina en el núcleo celular es detectable por técnicas inmunohistoquímicas y permiten el diagnóstico anatomopatológico del CFA sin ser necesario recurrir a técnicas de secuenciación para confirmar el diagnóstico histopatológico<sup>(5)</sup>.

### 1.2.2 El Microambiente Tumoral en el CFA

La malignidad asociada al cáncer con sus componentes de invasividad y comportamiento destructor, no están explicadas únicamente por la existencia de una población de células mutantes y perpetuas, sino también se explica por el desarrollo de un entorno que facilita y potencia el desarrollo tumoral como son la matriz extracelular, los vasos sanguíneos y las células del sistema inmune. Todos ellos permiten que el tumor actúe como un verdadero órgano. A este contexto tisular y homeostático se le denomina Microambiente Tumoral (MAT)<sup>(58)</sup> y en el caso del CFA, parece tener una especial relevancia al determinarse una pequeña población de células neoplásicas en un entorno heterogéneo y pluricelular que caracteriza a la RG, con astrocitos, fibroblastos asociados a cáncer (CAFs), Macrófagos Asociados al Tumor (TAM), neovasos sanguíneos y un magma rico en mediadores inflamatorios y células inmunes<sup>(59)</sup>.

Los CAFs son células que cada vez están teniendo mayor importancia en la explicación de los modelos oncogénicos. Se tratan de verdaderos fibroblastos que se asientan en el propio tumor y realizan funciones potenciadoras de los fenómenos invasores de las células cancerígenas al reorganizar la matriz extracelular para permitir su invasividad y aislar la presencia de respuesta inmune o tóxicos que supongan una amenaza para la viabilidad del tumor. El CFA se presentan en relación con procesos inflamatorios, cicatriciales son responsables de la formación de la membrana de los vasos sanguíneos. La existencia de matriz cicatricial y membrana basal de neovasos con presencia de fibroblastos nos hace hipotetizar sobre la existencia de CAFs y que este conjunto celular cumpla funciones importantes para el desarrollo del tumor<sup>(60)</sup>. Sistemas como TGF $\beta$ /Smad, IL-6 o señalizadores Wnt, todos ellos hiperactivados en el CFA, se demuestran como activadores de CAFs<sup>(61-63)</sup>.

La existencia de TAM es otro interesante campo de estudio en la etiología y sostenimiento del cáncer. La inducción de un fenotipo tipo TAM2 en los monocitos circulantes o sobre los macrófagos residentes en el tejido permite la inmunotolerancia hacia el tumor, promueve la autofagia o eliminación de residuos tumorales y su reutilización para los procesos anabólicos y modifica la matriz extracelular permitiendo la invasión y surgimiento de metástasis. La adquisición de este fenotipo tipo TAM2<sup>(64)</sup> de los macrófagos existentes en un tumor está dirigido en gran medida por las células tumorales, mediante la producción de mediadores que han demostrado encontrarse de manera significativa en el CFA como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-8, CXCL12, VEGF, TNF- $\alpha$ , MMP, EGF, PDGF, TGF-  $\beta$ , HGF<sup>(61-63)</sup>.

El modo en cómo se orquesta esta importante respuesta paracrina para la constitución del MAT está aún por establecer en el CFA, aunque parece existir diversas moléculas señalizadoras en la proximidad de las CC y que podrían tratarse de potenciales inductores de la respuesta microambiental<sup>(59)</sup>.

Entre los mediadores oncogénicos paracrinos detectados en proximidad a las CC (61,63) están Bone Morphogenic Protein (BMP): molécula producida aguas abajo de la vía WNT y que es inductora de la formación de hueso pudiendo estar relacionadas con el desarrollo de calcificaciones. Otra molécula de especial interés es Shh, que se trata del señalizador extracelular e iniciador de la vía SHH, una de las vías oncogénicas descritas con mayor frecuencia y que cuenta con diversos fármacos bloqueantes de su efecto y que pudieran

tener algún efecto sobre el CFA. Cabe destacar la existencia en altas concentraciones en la matriz tumoral de Metalopeptidasas 9 y 12 (MMP) indicando que las CC indujesen una tendencia colagenolítica que facilite la migración e invasión de tejidos sanos por parte del tumor.

Por otro lado, hemos de resaltar el importante componente inflamatorio presente en el MAT del CFA. El análisis del líquido presente en los quistes tumorales muestra un llamativo carácter proinflamatorio con niveles altos de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-18,  $\alpha$ -defensinas,  $\alpha$ 2-HS-glicoproteína,  $\alpha$ 1-antiquimiotripsina, apolipoproteína, inmunoglobulinas, complemento, proteína 2.3-deoxigenasa-1 (IDO) y de galactina-1 (LGALS1)<sup>(65,66)</sup>. Estos mediadores tienen funciones proinflamatorias e inmunomoduladoras lo que explica la importante presencia de linfocitos infiltrantes del tumor y la escasa respuesta inmune que se desarrolla ante el CFA<sup>(1)</sup>. Igualmente se han detectado concentraciones altas en CXCL12 y su receptor CXCR4 en el tejido del CFA y que se incrementan con las recidivas tumorales, estas son moléculas que fomentan la quimiotaxis de leucocitos, su presencia junto a los niveles altos recogidos del receptor de IL-2 y de otras moléculas inmunomoduladoras pueden contribuir a la anergia y secuestro inmune<sup>(61)</sup>.

También en cercanía a los cristales de colesterol existentes en las muestras del tumor, se organiza una respuesta inmune más significativa<sup>(66)</sup>. Este contexto inflamatorio es el que justifica la administración de IFN- $\alpha$  intraquístico o el desarrollo de ensayos con inhibidores de IL-1, IL-6, IDO y Checkpoint Inhibitors (CPI).

En xenoinjertos sobre ratones inmunodeprimidos, el comportamiento de los modelos CFA parecen seguir la patocronia e histología desarrollada en los humanos, sin embargo, las calcificaciones y contexto inflamatorio parece ser menor. Lo primero puede ser atribuible a la corta historia natural del tumor en el ratón transgénico ya que estos individuos tienen una vida de semanas y el modelo de CFA no podría evolucionar y madurar. La segunda particularidad es que los ratones carecen de un sistema inmune que pueda generar el componente inflamatorio que suele acompañar al CFA. Es destacable que la tendencia a progresar los modelos de CFA es mayor en los ratones jóvenes que en aquéllos añosos, fácilmente relacionable este hecho con que el CFA sea más frecuente en niños que en población adulta<sup>(7)</sup>.

### 1.2.3 Fenotipo Secretor Asociado a Senescencia en el CFA

La senescencia celular supone un proceso en el cual la célula frena su ciclo celular en respuesta a un estrés ambiental o daño genético para evitar propagar este error a sus células hijas. Sin embargo, la actividad metabólica de la célula está intacta y dedica mayores recursos a generar mediadores paracrinos, a esto se le denomina Fenotipo Secretor Asociado a Senescencia (SASP), que se ha descrito recientemente como un mecanismo oncogénico que consigue de manera indirecta fomentar el crecimiento del tumor a través de señalizadores prooncogénicos sin transmitir su mutación driver mediante división celular<sup>(67)</sup>. Este modelo parece ser el que mejor encaja en el comportamiento del CFA, en el que un pequeño conjunto de células asentadas en las CC y que muestran marcadores típicos de células troncales oncológicas o *cancer stem cells* (CSC), sufren inicialmente un crecimiento acelerado que genera un conglomerado celular denominado *cluster* y una posterior entrada en fase de senescencia con la producción de estimuladores mitogénicos descritos en estudios de microdissección. Estas moléculas prooncogénicas cumplen diversas funciones como son aumentar la tolerancia inmune al crecimiento del tumor, promover la multiplicación, migración, invasión y crecimiento tumoral, fomentar la aparición de nuevas CSC y favorecer la angiogénesis y remodelación de la reacción glial (RG) circundante al tumor<sup>(59)</sup>.

Los modelos de SASP hasta la fecha han sido escasamente descritos en el paradigma oncogénico, se han demostrado solo en hepatocarcinoma y en leucemia<sup>(67)</sup>. La formación del nudo del esmalte en el proceso de formación embriológica de los dientes se produce de una manera similar al modelo paracrino oncogénico del CFA, con el que verdaderamente comparte muchos de sus hallazgos histológicos<sup>(65)</sup>.

La existencia de un grupo celular en los tumores, con la capacidad de autorrenovarse y de generar nuevas células neoplásicas caracteriza a las CSC. Suelen ser un pequeño grupo celular pero verdaderamente dirigen la oncogénesis de toda la masa tumoral<sup>(58)</sup>. Su origen aun es incierto pero parecen corresponder a células troncales ya existentes en el tejido sano y que sufren una alteración neoplásica, a esto se le denomina *Oncogen-Induced Senescence* (OIS), que les ocasiona la perpetuidad y la división descontrolada pero sin embargo continúan compartiendo características de célula troncal sana como es la existencia de un ciclo celular largo o incluso quiescente y que en muchas ocasiones les

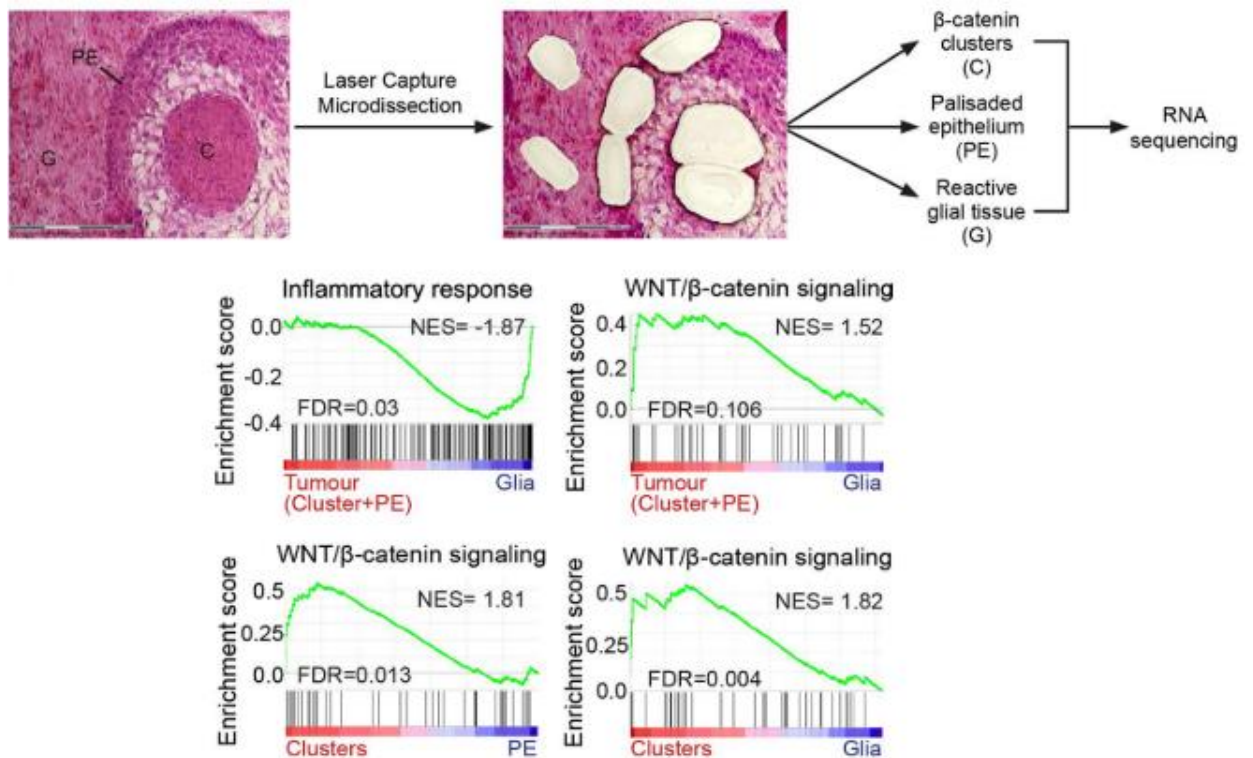
hace adoptar un SASP con la rica producción de mediadores oncogénicos necesarios para orquestrar el desarrollo del tumor o les confiere resistencia a los tratamientos oncológicos. La vía WNT ha demostrado ser uno de los fenómenos OIS que dan lugar al desarrollo de CSC como queda demostrado sobre todo en los estudios realizados sobre cáncer colorrectal. Estos rasgos de quiescencia han sido comprobados por la mayor expresión en las CC de los inhibidores del ciclo celular como  $\beta$ -galactosidasa, p16 y p21<sup>(59,68)</sup>.

En el caso del CFA existe una población de CSC ubicadas en las CC como se ha demostrado con marcadores de células troncales como SOX2, SOX9, Nestina, Pit1 o Hesx. Esta población es la que presenta la traslocación nuclear de la Beta-catenina y por tanto tiene activación en la vía WNT mientras que el resto de conjuntos celulares existentes en el tumor carecen de la traslocación nuclear de la Beta-catenina y se hipotetiza con que su proliferación venga determinada por fenómenos paracrinos generados por las CSC en las CC al haberse demostrado por técnicas de marcado que su linaje no proviene de CSC afectadas por la traslocación nuclear de la Beta-catenina<sup>(61,68)</sup>. En **Figura 5** se muestra la frecuencia para mutaciones en vía WNT en las distintas áreas del CFA.

Además, por estudios de microdissección, se conoce que en las proximidades a las CC existen una amplia concentración de señalizadores oncogénicos como Interleucina-6 (IL-6), Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF), Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF), Factor de Crecimiento Vascular (VEGF) y Factor de Crecimiento Tumoral (TGF)<sup>(69)</sup>.

Otros modelos oncogénicos paracrinos han sido confirmados en modelos murinos e *in vitro*, en que células troncales epiteliales han sufrido un *knock down* en Notch1 o sobreexpresión en MEK1 generándose tumores donde el grueso celular se componía de células que presentan Notch1 o MEK1 en forma *wildtype*. Igualmente *in vivo* se ha conseguido un *knock down* de TP53 en células troncales hepáticas que ha generado un hepatocarcinoma TP53 conservado o introducción de Beta-catenina resistente a la degradación en osteoblastos que han producido una leucemia mieloide aguda con presencia exclusiva de la Beta-catenina a nivel citoplasmático<sup>(70-73)</sup>.





**Figura 5: Frecuencia de Activación en vía WNT en CC con respecto a otras regiones del CFA:** Se representa estudio de microdissección láser donde se realiza secuenciación de RNA de las diversas áreas histológicas del CFA. Se observa que la activación en vía WNT está presente únicamente en las células que integran las Cluster Cells. C: Cluster Cells; FDR: Tasa de Falsos Positivos; G: Tejido glial reactivo; NES: Puntuación de Enriquecimiento Normalizado; PE: Epitelio en Empalizada. *Tomado y modificado de Apps JR, Carreno G, Gonzalez-Meljem JM, Haston S, Guiho R, Cooper JE, et al. Tumour compartment transcriptomics demonstrates the activation of inflammatory and odontogenic programmes in human adamantinomatous craniopharyngioma and identifies the MAPK/ERK pathway as a novel therapeutic target. Acta Neuropathol. 2018;135(5):757–77.*

#### 1.2.4 Modelo Oncogénico Paracrino en el CFA

Como se ha comentado el CFA es un cáncer complejo en su patogenia, llamativamente heterogéneo en su histología y fuertemente recidivante y agresivo localmente. Estos hechos requieren de modelos explicativos en su comportamiento.

De lo demostrado a través de estudios tisulares y xenoinjertos, hace probable que en el CFA exista un modelo de desarrollo oncogénico no celular a partir de estímulos paracrinos<sup>(1,62)</sup>. En el propio tejido del CFA pueden distinguirse la existencia de una RG circundante al tumor rica en microglía, CAF, vasos sanguíneos y leucocitos sobre el que se asientan acúmulos celulares denominados CC y éstos están dispuestos en las bases de las regiones más proliferativas celularmente del CFA (determinados por Ki-67) como es el frente de avance de un epitelio en empalizada<sup>(74)</sup>.

Ya expuesto con anterioridad, en las CC se encuentra la mutación en CTNNB1 y expresada consecuentemente la Beta-catenina nuclear, sello distintivo de activación de la vía WNT. Este hecho está limitado al pequeño subconjunto celular de las CC mientras el resto de células del tumor no muestran la traslocación característica de la Beta-catenina y sin embargo presentan una actividad mitótica y una invasividad exacerbadas<sup>(1,2,61,62)</sup>.

Por estudios de linaje celular, se demuestra, que las células con traslocación nuclear de la Beta-catenina que integran los nidos de CC, se corresponden con células troncales que han adoptado un SASP. En su cercanía se localizan múltiples y reconocidos señalizadores oncogénicos ya comentados como FGF, EGF, WNT o SHH entre otras moléculas. También por marcadores de linaje, se confirma, que el grueso de células presentes en el tumor, no descienden de las CC y su estímulo oncogénico debería corresponder con otro mecanismo y a falta del mutagénico carente en dichas células, la explicación paracrina parece ser la más viable. De hecho, diversos estudios sobre modelos murinos confirman que el generar la mutación CTNNB1 en células troncales hipofisarias, provoca un comportamiento idéntico al que se desarrolla a modo *wildtype* en el CFA: una proliferación celular limitada a modo de nidos de CC y la posterior entrada en quiescencia en su ciclo celular, con la generación de múltiples señalizadores mitogénicos<sup>(59,62,65,68)</sup>.

Entre estos señalizadores expuestos anteriormente, nunca se ha demostrado la existencia de la SP o de su receptor NK-1R siendo el binomio SP/NK-1R una reconocida vía de

señalización y potenciación de los fenómenos oncogénicos<sup>(75)</sup> y que podría estar relacionado en el modelo paracrino que organiza el MAT presente en el CFA.

### 1.3 La SP y el NK-1R

La SP, es un neuropéptido que tradicionalmente se ha reconocido como un neurotransmisor involucrado en el impulso sináptico. Posteriormente se ha identificado como un mediador inflamatorio y en las últimas décadas se le ha relacionado estrechamente como un elemento acelerador del proceso oncogénico<sup>(75-77)</sup>.

La SP puede actuar a modo autocrino, paracrino, endocrino y nucleocrino<sup>(78)</sup> sobre las células al unirse a su principal receptor de membrana, el NK-1R y desencadenar por un proceso acoplado a proteína G la activación de diversas vías oncogénicas: MAPK, WNT, el efecto Warburg, la angiogénesis y la transición epitelio-mesénquima<sup>(77,79)</sup>.

La evidencia de la importancia del sistema SP/NK-1R en el cáncer viene determinada por diversos estudios<sup>(75)</sup> que demuestran que: 1) La SP se expresa en células tumorales; 2) El NK-1R se sobreexpresa en células tumorales; 3) El NK-1R es esencial para la supervivencia celular 4) La SP induce proliferación celular; 5) La SP genera señales antiapoptóticas. 6) SP y NK-1R han sido identificados en células tumorales y en vasos sanguíneos peritumorales; 7) SP promueve la migración celular. 8) Tejidos malignos expresan más NK-1R que benignos y existe correspondencia entre la malignidad y la expresión de NK-1R; 9) El bloqueo del NK-1R a través de antagonistas ha demostrado un significativo efecto oncolítico en líneas celulares tumorales o en xenoinjertos tumorales.

Aunque nunca se ha descrito la existencia de SP/NK-1R en el CFA, sí se ha demostrado en muchos otros tumores y destaca la concentración de la SP en los núcleos de las células tumorales con respecto a la menor presencia de éste en el núcleo de las células normales, haciéndonos hipotetizar sobre el papel de modulador genético de la molécula. La localización de la SP en el estroma de los tumores o sobre los vasos sanguíneos nos hace plantear igualmente el papel paracrino que puede tener. El NK-1R también está descrito en un amplio número de tumores y tiene una presencia significativamente más alta en tumores que en tejidos sanos<sup>(75,77)</sup>.

Este trabajo trata de demostrar la existencia del sistema SP/NK-1R en el CFA y su posible papel en el fenómeno de señalización oncogénico existente en el tumor regido por la población de CC y que pudiera tener implicación terapéutica futura para luchar contra la enfermedad.

### 1.3.1 Generalidades de la de la SP y el NK-1R

La SP es undecapéptido expresado en la totalidad de tejidos del organismo<sup>(76,80)</sup>. Pertenecce a la familia peptídica de las taquikinas (SP, Neurokinina A, Neurokinina B y Hemokinina-1) que ejercen sus funciones a través de los receptores de Neurokinina 1, Neurokinina 2 y Neurokinina 3<sup>(81)</sup>. El primero (NK-1R) es por el que tiene más afinidad la SP y mediante el cual ejerce las múltiples acciones fisiológicas y fisiopatológicas de este señalizador: efecto inflamatorio, trófico, cicatrizador, regulador cardiovascular y neurotransmisor entre otras<sup>(76)</sup>.

Las taquikinas provienen de la familia de genes preprotaquininas o TAC. Los péptidos pertenecientes a esta familia se caracterizan por compartir un extremo carboxiterminal integrado por la secuencia de aminoácidos Phe-X-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> con el que se une a su receptor de Neurokinina<sup>(82)</sup>. La secuencia carboxiterminal de la SP es precisamente: Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met y fue secuenciada por Susan E Leeman en 1971<sup>(80)</sup>.

La SP al alcanzar la membrana celular se une preferentemente al NK-1R, que se trata de un receptor acoplado a proteína G o de siete dominios transmembrana. Al unirse al SP activa segundos mensajeros (Fosfolipasa C y Adenilato Ciclasa) produciendo los cambios en el comportamiento celular<sup>(83)</sup>.

La SP es un péptido altamente conservado en las diferentes especies y cuyo descubrimiento se remonta al año 1931 por parte de Von Euler y Gaddum en el cerebro e intestino de caballo<sup>(84)</sup>. Su origen se asocia a su inicial reconocimiento como neurotransmisor tanto en el sistema nervioso central como periférico y estar importantemente representado en la inervación perivascular por lo que las funciones vasomotoras y difusivas vasculares pueden deberse en gran parte a su función. Está involucrado en la conducción del dolor y en los circuitos cerebrales que rigen las náuseas, el dolor, la depresión y la ansiedad<sup>(85-87)</sup>.

La SP y su receptor están involucradas en el proceso de cicatrización de las heridas y fomenta *in vitro* el crecimiento de fibroblastos y la reorganización colágena<sup>(88)</sup>. También induce proliferación de diversos tejidos como músculo liso o tejido hematopoyético entre otros<sup>(89,90)</sup>.

Actualmente es reconocido como el neurotransmisor con expresión más generalizada en el sistema nervioso central, especialmente importante para activación del sistema nervioso simpático. Se demuestra generación de SP en regiones del sistema límbico en respuesta a situaciones de estrés y supone el inicio del eje hipotálamo-pituitario-adrenal<sup>(76,91)</sup>.

La SP es generada por diversos tipos de células y tiene funciones paracrinas, autocrinas y endocrinas para el resto de las células del organismo. Su enorme ubicuidad le permite ejercer sus funciones a través de terminaciones nerviosas, flujo sanguíneo o líquido intersticial por señalización regional. Es una molécula muy estable en plasma, pero presenta una vida media en el tejido extracelular muy escasa debido a su rápida internalización hacia el interior de las células e hidrólisis por peptidasas<sup>(75)</sup>.

En astrocitos, neuronas y microglía se ha determinado la presencia de receptores NK-1R. En el tejido neural, a parte del comentado efecto de transmisión del impulso nervioso y sus efectos neuroactivadores, induce la producción de gran cantidad de moléculas biológicamente activas, potencia la diferenciación y supervivencia de las neuronas, influye en la homeostasis del hierro y el glucógeno en el tejido neural, regula la sinaptogénesis, la recaptación y los mecanismos inmunes<sup>(92)</sup>.

Es significativa la presencia de receptores NK-1R en las células del sistema inmune. Se ha determinado su presencia en mastocitos, células dendríticas, linfocitos NK, B y T, macrófagos y eosinófilos. Este hecho junto a la rica producción de SP por estas células, nos hace sospechar en que la SP cumple funciones relevante en estas células y parece potenciar la producción de productos inmunológicos y mediadores de la inflamación<sup>(93)</sup>.

### 1.3.2 Fisiopatología de la de la SP y el NK-1R

Debido a sus diversas funciones. La alteración en los mecanismos de regulación del sistema SP/NK-1R puede generar patología a diversos niveles<sup>(76)</sup>.

Como se ha comentado el mecanismo SP/NK-1R es un importante mediador de la inflamación neurogénica, produciendo vasodilatación, aumento de la permeabilidad capilar, extravasación de plasma, dolor y quimiotaxis de las células inflamatorias. Fomenta asimismo la diferenciación y proliferación leucocitaria y la producción de citoquinas e inmunoglobulinas. Existe una perpetuación en los mecanismos de inflamación crónica de la actividad señalizadora de la SP y podría ser éste un mecanismo terapéutico potencial en el caso de enfermedades como la enfermedad inflamatoria intestinal, el asma o la artritis reumatoide<sup>(94)</sup>.

Conociendo la implicación de la SP como mediador en los mecanismos reguladores de la afectividad y su presencia destacada en centros cerebrales como la amígdala o el hipocampo, el bloqueo de NK-1R para control de trastornos de ansiedad puede constituir un campo de especial interés terapéutico<sup>(95)</sup>.

Se ha hipotetizado con funciones reguladoras importantes de la SP para el crecimiento y diferenciación de las células hematopoyéticas. La liberación de SP desde las terminales nerviosas en médula ósea parece cumplir un papel relevante en el delicado microambiente hematopoyético. Cabe señalar que los linfoblastos presentan 3-4 veces mayor número de receptores NK-1R que los linfocitos maduros, por lo que el efecto trófico sobre esta población celular puede constituir un señalizador de su proliferación y maduración<sup>(96)</sup>.

Se han desarrollados antagonistas del receptor NK-1R, que ejercen funciones antiinflamatorias, analgésicas, antidepressivas, ansiolíticas, antipruriginosas y antieméticas. De hecho, el tratamiento antiemético, es el que más progresos clínicos ha tenido y hoy en día existen comercializados dos fármacos con fines antieméticos y usados rutinariamente como profilaxis antiemética en los esquemas de quimioterapia: el aprepitant y su profármaco fosaprepitant<sup>(97-99)</sup>.

### 1.3.3 La SP y el NK-1R y su implicación en el cáncer

Numerosos estudios han demostrado la implicación del sistema SP/NK-1R en el cáncer<sup>(75,77,100)</sup>. La existencia de SP se ha demostrado en muchos tumores como glioma, retinoblastoma o neuroblastoma entre otros y se expresa de una manera más importante en el propio tumor o en regiones peritumorales que en tejidos sanos<sup>(75,77,100)</sup>.

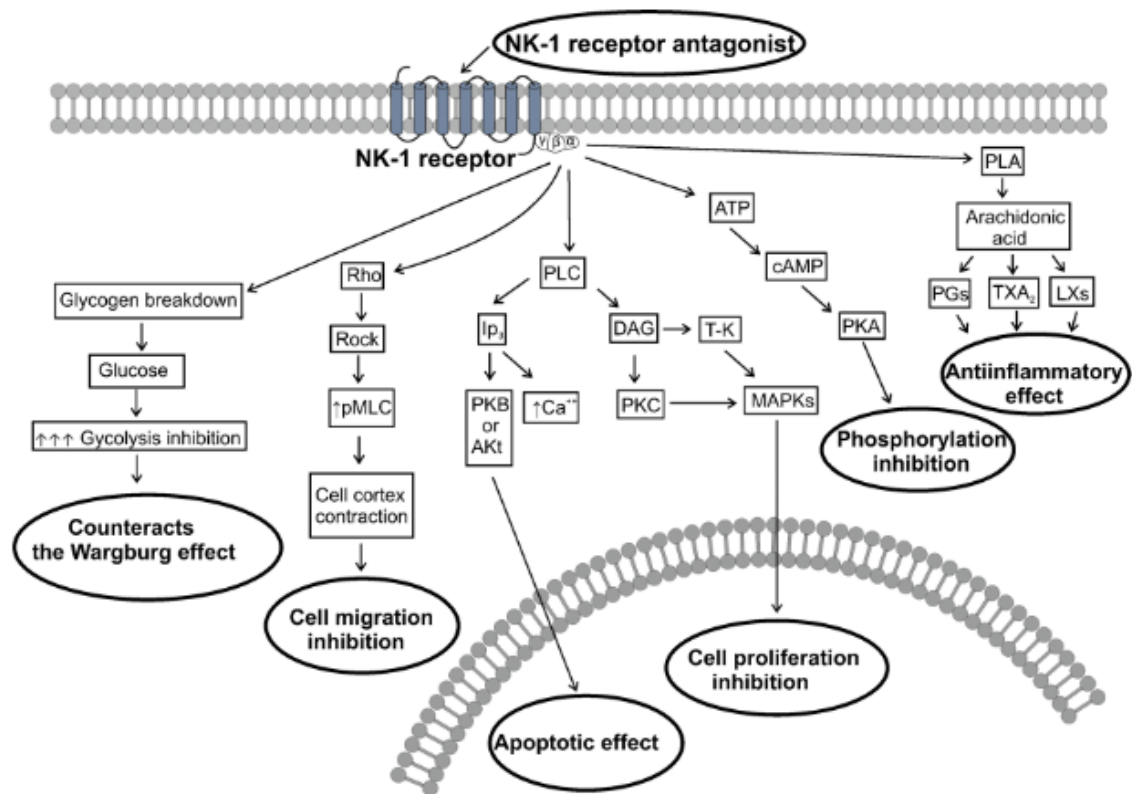
La SP se distribuye preferentemente en los núcleos y citoplasmas de las células no tumorales. Sin embargo, en células tumorales la expresión nuclear es más significativa y hace sospechar que la SP pueda ejercer de modulador de la expresión génica y tenga funciones relevantes en el desarrollo y mantenimiento de la célula oncológica<sup>(75,101,102)</sup>. Estudios realizados sobre modelos in vitro confirman que la administración de SP a cultivos de líneas celulares cancerosas generan una mitogénesis más significativa con respecto a cultivos carentes de este factor<sup>(75,77,79)</sup>.

Se puede hipotetizar con la existencia de mecanismos de adicción oncogénicos asociados a la SP. Este tipo de fenómeno consiste en el desarrollo de una dependencia importante a determinadas vías de señalización o sustancias por parte de la célula tumoral, a modo de una verdadera adicción. La supresión de esta sustancia dificulta la supervivencia de la célula<sup>(103)</sup>. Existen otros péptidos con demostradas acciones adictivas para la célula tumoral como es el caso de la glutamina<sup>(104)</sup>.

Como se ha comentado la SP puede actuar como señalizador extracelular por mecanismos auto, para y endocrinos y activa aguas abajo o *downstream* diversas vías de división y perpetuidad celular como la de la Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK), Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) o la Mammalian Target Of Rapamycin (mTOR) por inducción directa de la proteína Akt como se ha demostrado sobre leucemia aguda, carcinoma esofágico o astrocitoma<sup>(100,105-107)</sup>. Ver **Figura 6** donde se representan las principales vías oncogénicas aguas abajo inducidas por la activación del NK-1R. También se ha descrito que la SP induce la producción de mRNA de los oncogenes c-myc y c-fos y que fomenta la expresión del receptor EGFR en la membrana de las células de cáncer de mama<sup>(108,109)</sup>.

Varios estudios han destacado la asociación del mecanismo SP/NK-1R y la activación de la vía WNT<sup>(100)</sup>. La administración de antagonistas de NK-1R consiguen la supresión de dicha vía al evitar la unión de la Beta-catenina con el factor de transcripción Forkhead box M1 (FOXM1)<sup>(110)</sup>. En líneas celulares del cáncer de colon, donde la vía Wnt es el principal mecanismo oncogénico afecto, el bloqueo con antagonistas NK-1R conduce a disminución de la producción de Ciclina D1, VEGF, c-myc Y LEF-1 bloqueando el ciclo celular en fase G2 y fomentando la apoptosis<sup>(111)</sup>. También en línea celular de hepatoblastoma se ha demostrado bloqueo de vía WNT por antagonistas de NK-1R<sup>(112)</sup>.





**Figura 6:** *Modelo de señalización intracelular accionado por la SP tras la unión a NK-1R.* Observar la activación de diversas vías oncogénicas aguasabajo. ATP: Adenosina trifosfato; cAMP: Adenosina monofosfato cíclico; DAG: diacilglicerol; Ip<sub>3</sub>: Inositol Trifosfato; LXs: Leucotrienos; MAPKs: Mitogen-Activated Protein Kinase; PGs: Prostaglandinas PKA: Protein Kinase A; PKB: Protein Kinase B; PKC: protein Kinase C; PLA: Fosfolipasa A; PLC: Fosfolipase C; pMLC: Cadena ligera de Miosina fosforilada; T-K: Tirosín-quinasa; TXA<sub>2</sub>: Tromboxano A<sub>2</sub>. *Tomado de Muñoz M, Coveñas R, Esteban F, Redondo M. The substance P/NK-1 receptor system: NK-1 receptor antagonists as anti-cancer drugs. J Biosci. 2015;40(2):441–63.*

El sistema SP/NK-1R también ha demostrado influir en el metabolismo glucídico de la célula y ser un potenciador del efecto Warburg, la llamada glucólisis anaerobia selectiva por el que las células tumorales obtienen fosfato suficiente para sintetizar sus cadenas nucleotídicas a través de procesos de glucólisis láctica en condición de aerobiosis<sup>(113,114)</sup>.



La angiogénesis es uno de los procesos destacados en el desarrollo del cáncer. Se ha detectado la presencia importante de SP/NK-1R en las proximidades de los vasos sanguíneos tumorales. De hecho, parece ser que este sistema influye en el proceso de neoangiogénesis<sup>(115,116)</sup>. Además, la administración de SP a cultivos tumorales, induce el proceso de angiogénesis mientras los antagonistas de NK-1R producen disminución de los niveles de VEGF y de Hypoxia Inducible Factor 1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ), moléculas esenciales para el crecimiento de las células endoteliales<sup>(117,118)</sup>.

Por otro lado, la SP tiene un efecto antiapoptótico en células sanas y tumorales. Su adición en cultivos celulares provoca perpetuidad celular y su bloqueo causa el paro del ciclo celular y la entrada en apoptosis de las células<sup>(108,119,120)</sup>.

La SP está implicada en el proceso de migración de la célula tumoral a través de la activación de la vía Rho que produce cambios en el citoesqueleto y membrana celular, fomentándose así la transición epitelio-mesénquima, el cambio conformacional de las células y la reorganización de la matriz celular a través de la producción de metaloproteinasas como MMP-2<sup>(121)</sup>. La administración de SP a cultivos celulares produce cambios hacia la mesenquimalización o *blebbing*<sup>(122,123)</sup>. Por otro lado, se ha demostrado que la SP induce aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE) y está involucrada en el desarrollo del edema peritumoral de tumores cerebrales. Se ha demostrado que regiones con importante edema metastásico secundario a rotura de la BHE poseen altos niveles de SP<sup>(124)</sup>.

Como se ha comentado el binomio SP/NK-1R es un importante proinflamatorio y por tanto puede estar involucrado en el proceso inmune asociado al desarrollo del cáncer. En líneas celulares de astrocitoma se demuestra que la SP produce una elevación en los niveles de IL-6 e IL-8 a través de la potenciación de las vías MAPK y Nuclear Factor-Kappa B (NF- $\kappa$ B)<sup>(125,126)</sup>.

Por otro lado, la detección de NK-1R es mayor en el tejido tumoral que en los tejidos sanos e incluso la intensidad de su expresión se corresponde con el grado de malignidad histológica de un tumor<sup>(77,127,128)</sup>. Está localizada preferentemente en la membrana y citoplasma de células tumorales. Estudios sobre cultivos celulares oncológicos demuestran que el bloqueo del NK-1R por antagonistas conduce al arresto mitótico y a la muerte celular. De hecho, el aprepitant y otros antagonistas han demostrado efectos antitumorales in vitro sobre diversos tipos de cáncer, sugiriendo su utilidad terapéutica in

vivo<sup>(119)</sup>. Por el contrario, el knockdown de NK-1R mediante ARN silenciador (siRNA) conduce a la muerte celular de los cultivos tumorales *in vitro*<sup>(78)</sup>. El uso de antagonistas de NK-1R aumenta la detección de proteínas antiapoptóticas (p21, p73, Bax, Bid and Bad) en cultivos celulares<sup>(129)</sup>.

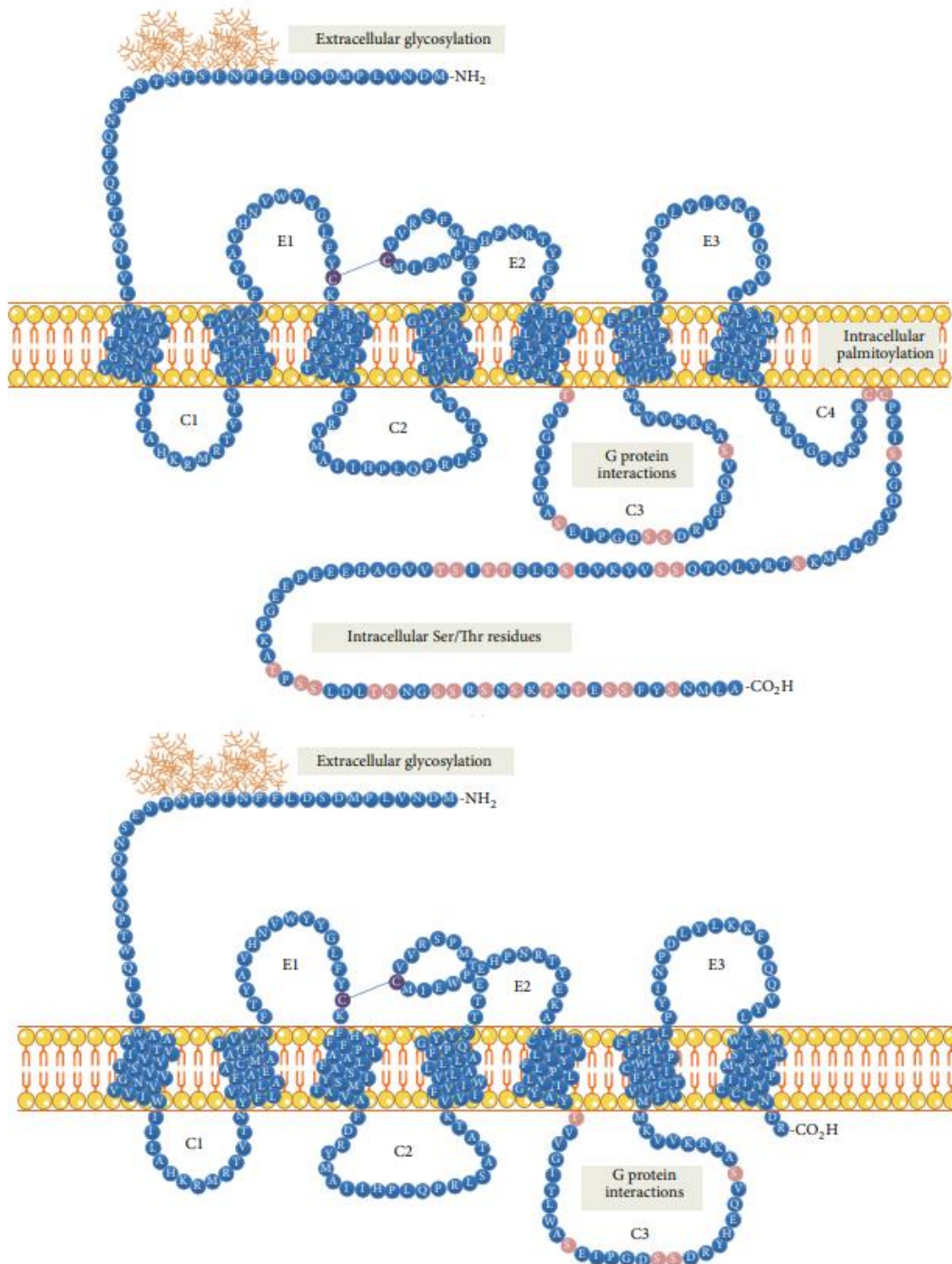
Existen dos isoformas de NK-1R, una forma completa y una truncada, que difieren en su terminación carboxiterminal. En la forma truncada, la carencia de diversos aminoácidos repercute sobre la posibilidad de fosforilar e internalizar el receptor. Es por ello que, aunque la activación de ambas fomenta el mecanismo oncogénico, la última parece potenciar de modo más importante este hecho<sup>(113)</sup>. Parece que el factor transcriptor NF- $\kappa$ B induce la transcripción de la forma truncada. El NF- $\kappa$ B es una citoquina con demostrado efecto de adicción oncogénico<sup>(130)</sup>.

Se ha demostrado que la forma truncada del NK-1R tiene mucha mayor presencia en líneas celulares tumorales que con respecto a líneas celulares inmortalizadas, por lo que se cree que la forma truncada del receptor tiene un papel oncogénico mucho más importante que la forma completa del mismo<sup>(131)</sup>.

El control de la internalización del receptor NK-1R está altamente regulado por diversos mecanismos que incluyen la retroalimentación negativa por niveles altos extracelulares de SP e intracelularmente por la  $\beta$ -arrestina, una proteína con funciones de ubiquitinización. La función de esta última se ve anulada por la ausencia de un dominio de unión en el extremo intracelular de NK-1R<sup>(132)</sup>. Ver en **figura 7** las diferencias entre las dos isoformas de NK-1R.

Se han desarrollado estudios preclínicos tanto *in vitro* como en modelos murinos en el que se han demostrado efectos antineoplásicos con los antagonistas del NK-1R al inducir la apoptosis. Se ha demostrado esta efectividad en diversas líneas celulares tumorales como carcinoma de laringe, glioma, neuroblastoma, rhabdomyosarcoma, leucemia, osteosarcoma, linfomas, carcinoma de páncreas, carcinoma de estómago, retinoblastoma, melanoma y carcinomas de pulmón, mama y colon. Se ha confirmado igualmente que el uso de antagonistas de NK-1R disminuyen la actividad de la oncoproteína Akt<sup>(133)</sup>.

Sobre xenoinjertos de cáncer de mama en ratones inmunosuprimidos, se ha conseguido inhibir la progresión del tumor administrando aprepitant durante dos semanas<sup>(133)</sup>.



**Figura 7: Representación de las isoformas de NK-1R.** Se exponen las dos isoformas del receptor NK-1R. Arriba la isoforma completa con su largo segmento intracelular que permite una internalización y degradación apropiadas del receptor de membrana. En la parte inferior aparece representada la isoforma truncada con la ausencia del largo extremo carboxiterminal expuesto al citoplasma, lo que dificulta la degradación del receptor, aumentando su tiempo de permanencia en la membrana celular y por tanto perpetuando

la activación de señal hacia el núcleo celular. *Tomado de Garcia-Recio S, Gascón P. Biological and Pharmacological Aspects of the NK1-Receptor. Biomed Res Int. 2015;2015:495704.*

También cabe destacar que los antagonistas de NK-1R han demostrado bloquear el cambio de forma celular hacia la mesenquimización que sufre la célula tumoral previo a su migración metastásica. Además, bloquean el proceso angiogénico y las mitosis endoteliales in vitro<sup>(122)</sup>.

Se puede resumir que la SP tras su unión al NK-1R induce la proliferación celular, un efecto antiapoptótico, facilita la migración celular que precede la invasión y las metástasis así como la angiogénesis y se ha demostrado que el bloqueo del NK-1R, a través de antagonistas inhibe la proliferación celular, produce la muerte de la célula tumoral se evita la migración y la neovascularización con un efecto global antioncogénico<sup>(133)</sup>.

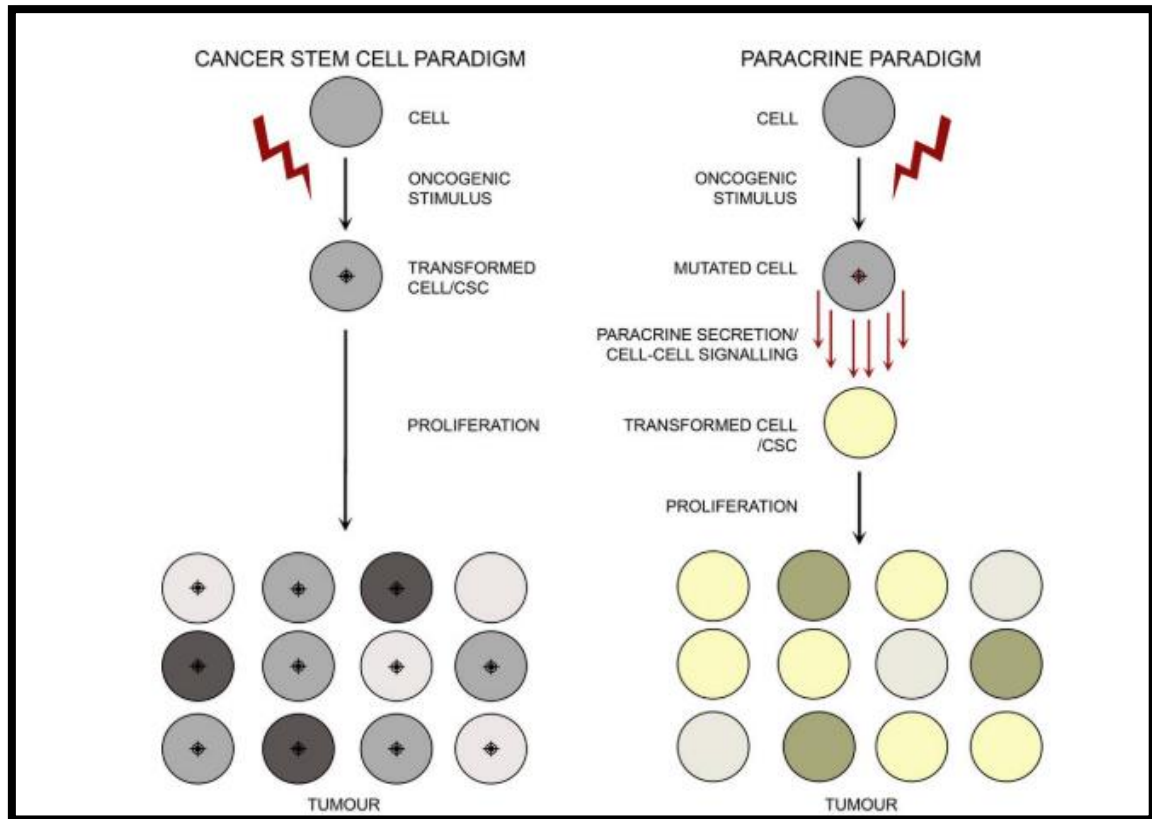
## 2. Justificación, Pertinencia y Objetivos

Como se ha comentado, el CFA es un tumor cuyo tratamiento actual entraña una marcada morbilidad y aun así presenta una alta tasa de recidiva. Con lo que es necesario el desarrollo de nuevos y eficaces tratamientos que mejoren su pronóstico.

Gracias al conocimiento cada vez mayor de la biología molecular del CFA, podemos tratar de bloquear con nuevos medicamentos diana el desarrollo de este tumor. Como ya se ha expuesto, se ha descubierto en los últimos años que el CFA sufre un proceso de desarrollo oncogénico basado en mecanismos paracrinos y no en multiplicación descontrolada de un clon celular. En la **figura 8** se esquematiza la diferencia entre el clásico modelo de expansión clonal de la célula mutada y el modelo paracrino más novedoso.

El origen del tumor parece deberse a la mutación somática por ganancia de función en la Beta-catenina que ocurre en células troncales, lo que genera CSC que sufren inicialmente un proceso de multiplicación acelerada generando un llamativo conglomerado celular denominado CC que posteriormente sufre la entrada en fase de senescencia y adquiere un SASP con la generación de diversos mensajeros paracrinos con señales mitóticas e inmunógenas sobre el resto del tejido tumoral, promoviendo el crecimiento y maduración del microambiente que rodea a las células oncológicas. Estas CSC son portadoras de la Beta-catenina mutante, sin embargo, el resto de células del tumor no poseen dicho *driver* oncogénico ni son descendentes del linaje de estas CSC.

Poniendo de relevancia la importancia de los señalizadores paracrinos en el CFA y habiendo sido reconocida la SP y su receptor NK-1R como mecanismos de comunicación vitales para la supervivencia y progresión en muchos otros tumores, se hipotetiza que tanto la SP como su receptor NK-1R estén presentes en el CFA y ejerzan señales mitogénicas derivadas de las CC hacia el resto del grueso tumoral.



**Figura 8: Modelo de expansión mutacional y modelo SASP:** se muestra a la izquierda la generación de una población clonal en que todas las células poseen la mutación oncogénica (+). En el lado derecho contrasta con un modelo SASP en el que las células oncogénicas se expanden por las señales que emite la célula que alberga la mutación (+). Tomado de Martinez-Barbera JP, Andoniadou CL. *Concise Review: Paracrine Role of Stem Cells in Pituitary Tumors: A Focus on Adamantinomatous Craniopharyngioma. Stem Cells.* 2016;34(2):268–76.

De lo expuesto en la introducción, existe evidencia de que muchos de los sistemas y biomarcadores esenciales en el CFA se vean potenciados por la SP como es la vía Wnt o la producción de IL-6 entre otros

Esta tesis está dirigida a determinar la expresión de la SP y del receptor NK-1R en el CFA en vistas al desarrollo futuro de nuevas terapias dirigidas al bloqueo del complejo mecanismo paracrino con el que cuenta el CFA.

Se constituyen como objetivos del estudio:

**Objetivo principal:**

- a. Determinar la presencia de la SP y del NK-1R en el CFA.

**Objetivos secundarios:**

- b. Describir la distribución de la SP y del receptor NK-1R en las diferentes zonas histológicas y en las diferentes células del CFA.
- c. Determinar la presencia de la SP y del NK-1R en el tejido hipofisario sano.
- d. Comparar la intensidad de la presencia de la SP y del receptor NK-1R en el CFA en comparación con el tejido hipofisario sano.

## 3. Material y Método

### 3.1 Diseño del Estudio

La hipótesis del estudio trata de esclarecer si la SP y el NK-1R se encuentran representados en el CFA y cuál es la distribución que presenta en dicho tumor. Para ello se diseñó este estudio observacional descriptivo de carácter anatomorfológico y que describe semicuantitativamente la presencia, intensidad y distribución de la SP y el NK-1R en muestras de CFA teñidas por métodos inmunohistoquímicos.

### 3.2 Población

Se solicitaron al biobanco del Hospital Universitario Virgen Del Rocío, piezas quirúrgicas de CFA procedentes de cirugías. Estas muestras fueron solicitadas según el procedimiento establecido en el Hospital Universitario Virgen del Rocío para petición de Biorecursos al Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía.

Se ceden para el estudio, muestras de 86 Microarrays tisulares (TMA) conservados en parafina, procedentes de 43 biopsias con diagnóstico anatomopatológico previo de CFA. Cada una de las biopsias fue por tanto representada por dos TMA. Todas las muestras procedieron del Banco de Tumores de Hospitales Universitarios Virgen Del Rocío-IBIS.

Las muestras se tiñeron inmunohistoquímicamente con los anticuerpos policlonales de conejo anti-Sustancia P (Sigma Aldrich, España: Referencia S1542 y Lote 030M4767 de 2014; 2ml) con tinción diluida a 1/1500 y anticuerpo policlonal de conejo anti NK-1R (SigmaAldrich, España: Referencia S8305 y Lote 083M4759 de 2014 de; 2 ml), con tinción diluida a 1/500.

Se aportaron controles negativos (dos biopsias de hipófisis sanas) y controles positivos (muestras de diferentes tejidos en los cuales se ha descrito la presencia de SP y NK-1R (testículo, riñón, adenocarcinoma de pulmón, placenta, carcinoma de tiroides, etcétera).

Todas las muestras fueron valoradas y aceptadas para incluirlas en análisis según los siguientes criterios de inclusión y exclusión.



### 3.3 Criterios de Inclusión y Exclusión

#### **Criterios de inclusión:**

1. Muestras con diagnóstico anatomopatológico previo de CFA valoradas por microscopía óptica con tinciones de hematoxilina y eosina y con opcionales técnicas inmunohistoquímicas de diagnóstico como la expresión contra la Beta-catenina.
2. Material histológico en buen estado de conservación sin daños ni artefactos en su procesamiento.

#### **Criterio de exclusión:**

1. Material histológico dañado o que no represente adecuadamente la biopsia de la que procede.

### 3.4 Análisis Histológico

Las muestras de CFA fueron teñidas inmunohistológicamente contra SP y NK-1R y fijadas en formaldehído al 4% (según es necesario por el protocolo indicado en la ficha técnica de los anticuerpos usados).

Anteriormente las muestras estaban conservadas en bloques de parafina. Se describe a continuación el procesamiento de las muestras para la realización de la técnica de inmunohistoquímica indirecta:

1. Corte y desparafinado de las muestras: se realizaron cortes de los tejidos entre 3`5 µm con un microtomo y se montaron en portaobjetos de microarrays tisulares destinados específicamente para inmunohistoquímica. Las muestras de tejido parafinado se incubaron durante 24 horas en la estufa a 37°C y 30 minutos antes de la realización de la inmunohistoquímica a 60°C.
2. Recuperación antigénica inducida por calor. Se realizó la recuperación del epítipo inducida por calor en el sistema Dako PT link (Dako, España), junto con la rehidratación del tejido. Para este proceso se emplearon las soluciones incluidas en el kit de inmunohistoquímica utilizado EnVision™ FLEX, High pH, (Dako, España). Se sumergieron los cortes de tejido en la solución EnVision™

FLEX solución de recuperación antigénica, pH bajo (50x) tampón de citrato (pH 6,1) (código K8005/DM829), diluida en agua destilada (1:10), durante 20 minutos a 96°C. Posteriormente tras dejar enfriar los cortes a 65°C, se realizó el lavado con solución EnVision™ FLEX Buffer de lavado (20x) (Código K8007/DM831), tamponada con solución Tris diluida con agua destilada (1:20) y a temperatura ambiente, durante 5 minutos.

3. Procedimiento automatizado de tinción inmunohistoquímica en analizador Autostainer Link. Preparación de los reactivos. El procesamiento y tinción del tejido se realizó de forma automatizada y estandarizada en Dako Autostainer Link analizador (Dako, España), mediante kit de inmunohistoquímica comercializado EnVision™ FLEX, High pH, (Dako España). De todas las soluciones necesarias para la realización de la inmunohistoquímica, se incorporaron directamente al analizador, por no precisar preparación: EnVision™ FLEX reactivo bloque ante de peroxidasa (código SM801): para la inhibición de la peroxidasa endógena ` EnVision™ FLEX/HRP (código SM802): dextrano unido a moléculas de peroxidasa y moléculas de anticuerpo secundario de cabra contra inmunoglobulinas de conejo. EnVision™ FLEX+rabbit (código K8009/SM805): para la incubación de cortes con anticuerpo secundario. EnVision™ FLEX Hematoxilina (código K8008/SM806): para la realización de la contratinción. EnVision™ FLEX Buffer de lavado (20x) (Código K8007/DM831) Sin embargo, fue necesaria la preparación de las siguientes soluciones (en la cantidad establecida según el protocolo de inmunohistoquímica para el analizador): EnVision™ FLEX Sustrato buffer (código SM803) y EnVision™ FLEX Cromógeno DAB+ (diaminobenzidina) (código DM827) en una proporción de una gota de cromógeno por cada 20 ml de sustrato. Dilución de anticuerpos policlonales primarios de conejo (anticuerpo antisustancia P (Referencia S1542, Sigma Aldrich, España) en proporción 1:2000 y anti RNK1 (Referencia S8305, Sigma Aldrich, España) en proporción 1:1000, con solución EnVision™ FLEX Diluyente de anticuerpo (código K8006/DM830). Se programaron en el software del autoanalizador, los pasos de tinción y los tiempos de incubación de los cortes en inhibidor de la peroxidasa endógena, en antisuero primario específico para cada anticuerpo, en anticuerpo secundario marcado con

peroxidasa, en el revelador con diaminobencidina y en la tinción de hematoxilina. En el caso del número de portaobjetos de nuestro estudio, se requirió un tiempo de tres horas de procesamiento.

4. Deshidratación del tejido y montaje. Tras finalizar el procedimiento automatizado con la contratinción con hematoxilina, se llevaron las muestras a agua destilada, y a continuación se realizó la deshidratación de las muestras mediante el paso de los portaobjetos por una batería de alcoholes a concentración creciente: 60% (30 segundos), 70% (30 segundos), 80% (30 segundos), 90% (5 minutos), 96% (5 minutos), 100% (5 minutos). Finalmente se pasaron las muestras por tres cubetas de xiloles, para eliminar el alcohol: de forma rápida en las dos primeras y en la tercera, el tiempo necesario hasta el montaje. A cada cristal sacado del xilol, se le colocó un cubreobjetos al que se le había añadido, pegamento Pertex. Tras el secado, las muestras están preparadas para la visualización del resultado con el microscopio óptico.
5. Control de calidad. En cada proceso de inmunohistoquímica se incluyó también una muestra de TMA de diferentes tejidos como control positivo tanto de SP como de NK-1R con el fin de asegurar un rendimiento correcto de todos los reactivos aplicados. En cada proceso de inmunohistoquímica se incluyó una muestra de TMA de diferentes tejidos como control negativo de especificidad del anticuerpo sustituyendo el anticuerpo primario por suero.

Tras el procesamiento de las muestras tisulares. Se prosiguió con su análisis al microscopio óptico mediante la observación directa en el laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital HM Montepíncipe.

Se valoró la presencia, distribución e intensidad de la inmunorreactividad en las diferentes regiones histológicas del CFA (CC, epitelio en empalizada, retículo y endotelio vascular) de cada muestra de TMA y se le otorgó un valor según clasificación cualitativa ordinal (presencia intensa, presencia, ausencia y pérdida).

### 3.5 Análisis Estadístico y Recogida de Datos

Cada TMA fue custodiado por el investigador, anonimizado y numerado para su identificación en el estudio.

Los datos correspondientes al análisis inmunohistológico se transcribieron e informatizaron en las tablas de frecuencia que se aporta en apartado de resultados.

Las frecuencias de distribución de la intensidad de las tinciones inmunohistoquímicas en cada región del tumor fueron comparadas con el método del T student. Se ha comprobado de este modo las diferencias existentes en la distribución y la intensidad de la expresión de la tinción entre cada región del tumor.

### 3.6 Consideraciones Éticas

Todos los datos han sido anonimizados y tratados con respecto a la Ley Orgánica 3/2018 de protección de Datos Personales y Garantía de los Derechos Digitales y al Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento Europeo y del Consejo del 27 de abril de 2016 de Protección de Datos (RGDP). Igualmente se han seguido los principios de la bioética (Beneficiencia, Justicia y Autonomía), nacidos de la declaración de Belmonte y de los principios reflejados en la Declaración de Helsinki.

Para la realización de este estudio se ha obtenido el dictado favorable del Comité Ético de Investigación Médica de Hospitales Universitarios Virgen Macarena-Virgen Del Rocío. Comité que ha ponderado y evaluado en sesión celebrada el 26/04/2018 y recogida en acta 05/2018.

Se acuerda y acepta la cesión de muestras biológicas por parte del Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía con número de solicitud 33180021.

### 3.7 Cronograma

Proceso	Nov 2017- may 2018	Jun-oct 2018	Nov 2018- may 2019	Jun-oct 2019	Nov 2019- ago 2020	Sep 2020-mar 2021	Abril 2021- dic 2021	Ene 2022-dic 2022	Ene 2023- Abril 2023
Inscripción Programa Doctoral									
Realización Complementos Formativos									
Planteamiento									
Recogida/procesa miento de datos									
Análisis									
Revisión									
Depósito de Tesis Doctoral									

## 4. Resultados

Se estudiaron 86 muestras de TMA procedentes de 43 piezas tumorales de CFA. 16 TMA no fueron valorables por pérdida de material anatomopatológico o expresión inadecuada con la inmunohistoquímica y en 6 de los mismos, alguno de los componentes histológicos del tumor que se determinó analizar no fueron representativos en TMA.

Las diferentes regiones histológicas del tumor son fácilmente identificables por microscopía óptica: Cluster Cells (CC), Epitelio en Empalizada (EE), Reacción Glial (RG) y Vasos Sanguíneos (VS). Los resultados de la distribución e intensidad de la SP y el receptor NK-1R determinados por inmunohistoquímica, aparecen representados en las tablas de frecuencias representada en las **Tablas 1 a 8**.

La SP aparece distribuida con marcada intensidad por toda la muestra de manera relativamente homogénea. Tiene preferencia por expresarse en los núcleos celulares, aunque también se expresa con menor intensidad en el citoplasma y tiñe difusamente el citoplasma de los oligodendrocitos y demás componentes inflamatorios de la microglía. Su detección aparece también en el intersticio celular. No han existido regiones del tumor que tengan una presencia más importante de SP en un modo estadísticamente significativo si bien las regiones con mayor densidad celular presentan expresión más importante de SP como en el caso de las CC o del EE.

Con respecto a NK-1R tiene una presencia más escasa, con una distribución mucho más discriminativa que la SP. Se localiza preferentemente en las membrana y citoplasma celular y adquiere una disposición a modo granular. Sin embargo en las células inflamatorias de la reacción glial, también se expresa en su núcleo. Su expresión de hecho fue más intensa a nivel de la reacción glial que con respecto al resto de compartimentos del CFA ( $p < 0.01$ ). Ver **Tablas**.

A nivel de la RG, la inmunoexpresión de NK-1R es llamativa a nivel de las células inflamatorias y células endoteliales. En los primeros además la expresión en el núcleo fue intensa.

		<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>
<b>Válido</b>	<b>No presencia</b>	5	5,8
	<b>Presencia</b>	52	60,5
	<b>Presencia muy intensa</b>	16	18,6
	<b>Total</b>	73	84,9
<b>Perdidos</b>		13	15,1
<b>Total</b>		86	100,0

**Tabla 1. Inmunotinción SP en CC**

		<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>
<b>Válido</b>	<b>No presencia</b>	2	2,3
	<b>Presencia</b>	55	64,0
	<b>Presencia muy intensa</b>	19	22,1
	<b>Total</b>	76	88,4
<b>Perdidos</b>		10	11,6
<b>Total</b>		86	100,0

**Tabla 2. Inmunotinción SP en EE**

		<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>
<b>Válido</b>	<b>No presencia</b>	4	4,7
	<b>Presencia</b>	60	69,8
	<b>Presencia muy intensa</b>	14	16,3
	<b>Total</b>	78	90,7
<b>Perdidos</b>		8	9,3
<b>Total</b>		86	100,0

**Tabla 3. Inmunotinción SP en RG**

		<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>
<b>Válido</b>	<b>No presencia</b>	5	5,8
	<b>Presencia</b>	68	79,1
	<b>Presencia muy intensa</b>	4	4,7
	<b>Total</b>	77	89,5
<b>Perdidos</b>		9	10,5
<b>Total</b>		86	100,0

**Tabla 4. Inmunotinción SP en Endotelio**

		Frecuencia	Porcentaje
<b>Válido</b>	<b>No presencia</b>	57	66,3
	<b>Presencia</b>	14	16,3
	<b>Presencia muy intensa</b>	4	4,7
	<b>Total</b>	75	87,2
<b>Perdidos</b>		11	12,8
<b>Total</b>		86	100,0

Tabla 5. Inmunotinción NK-1R en CC

		Frecuencia	Porcentaje
<b>Válido</b>	<b>No presencia</b>	45	52,3
	<b>Presencia</b>	23	26,7
	<b>Presencia muy intensa</b>	7	8,1
	<b>Total</b>	75	87,2
<b>Perdidos</b>		11	12,8
<b>Total</b>		86	100,0

Tabla 6. Inmunotinción NK-1R en EE

		Frecuencia	Porcentaje
<b>Válido</b>	<b>No presencia</b>	10	11,6
	<b>Presencia</b>	63	73,3
	<b>Presencia muy intensa</b>	3	3,5
	<b>Total</b>	76	88,4
<b>Perdidos</b>		10	11,6
<b>Total</b>		86	100,0

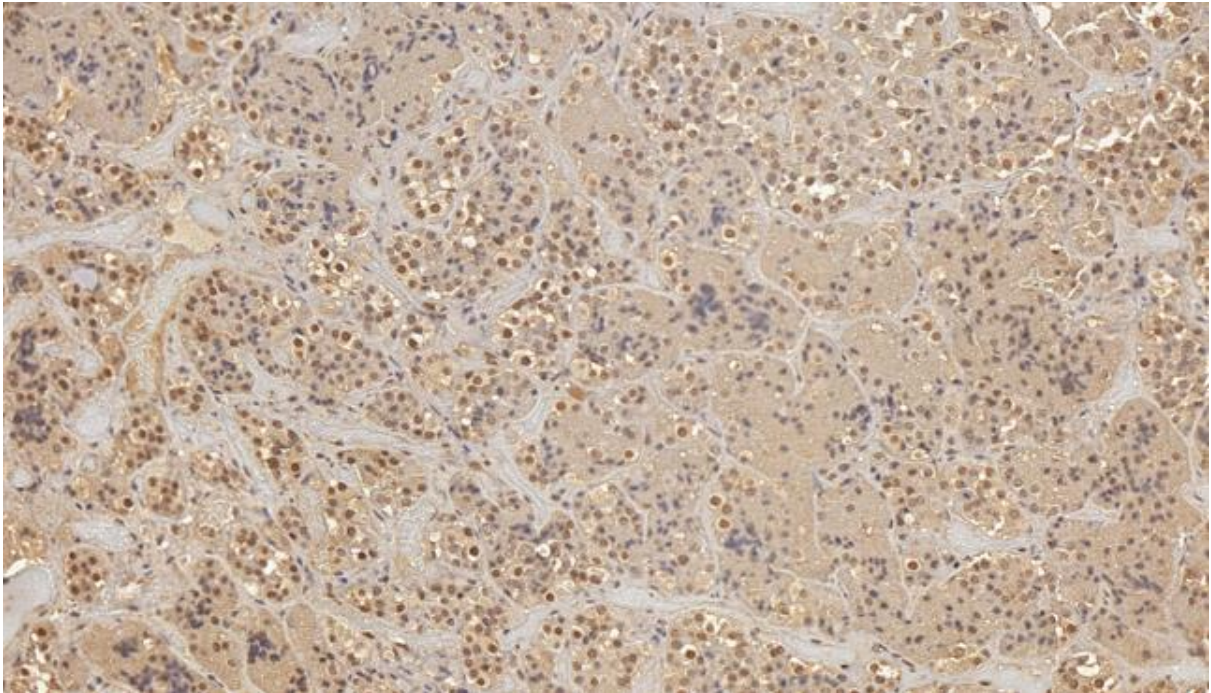
Tabla 7. Inmunotinción NK-1R en RG

		Frecuencia	Porcentaje
<b>Válido</b>	<b>No presencia</b>	37	43,0
	<b>Presencia</b>	38	44,2
	<b>Presencia muy intensa</b>	1	1,2
	<b>Total</b>	76	88,4
<b>Perdidos</b>		10	11,6
<b>Total</b>		86	100,0

Tabla 8. Inmunotinción NK-1R en Endotelio

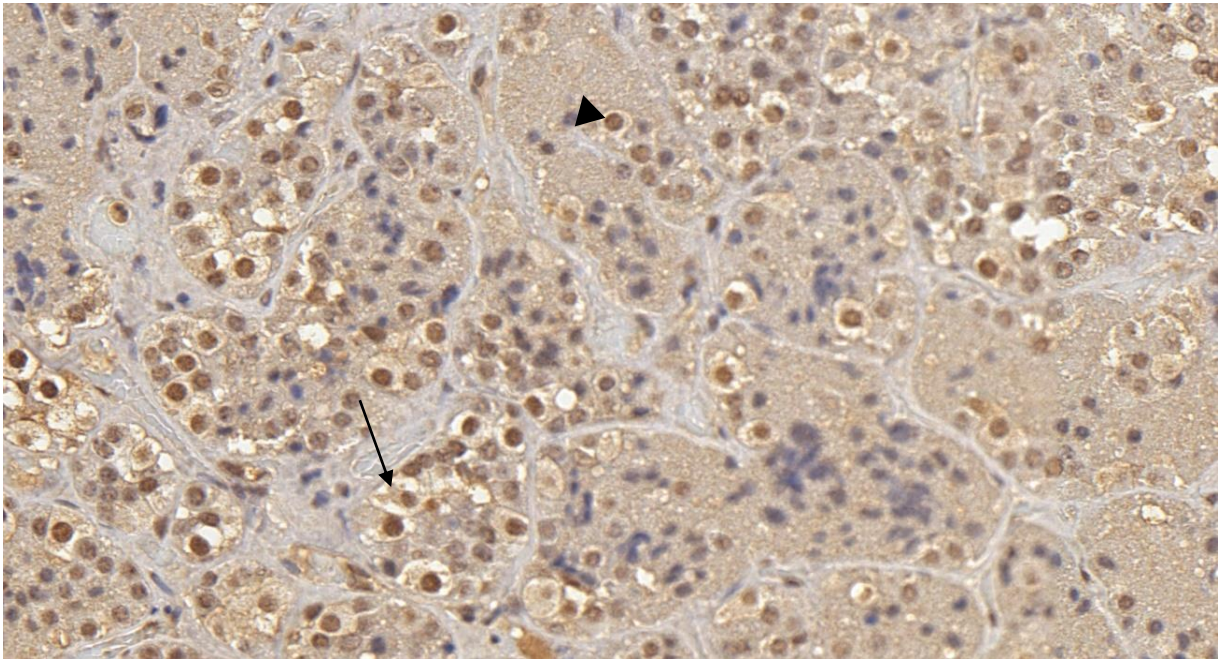


En la **Figura 9** se muestra un corte de hipófisis sana con su tinción inmunohistoquímica a SP.



**Figura 9:** Inmunorreactividad a SP en adenohipófisis 10X

En la **Figura 9** se representa microfotografía de adenohipófisis con inmunotinción a SP. La adenohipófisis es un órgano heterogéneo con existencia de diferentes extirpes de células parenquimatosas rodeadas por fibras reticulares. Las células parenquimatosas son diferentes según la hormona que produzcan. No es posible conocer el subtipo celular sin técnicas específicas de inmunohistoquímica. Se observa como la SP se inmunolocaliza a modo difuso en la adenohipófisis. Se encuentra con mayor intensidad en los núcleos y citoplasmas de las células parenquimatosas dejando a las fibras reticulares desprovistas del immunoanticuerpo contra SP.

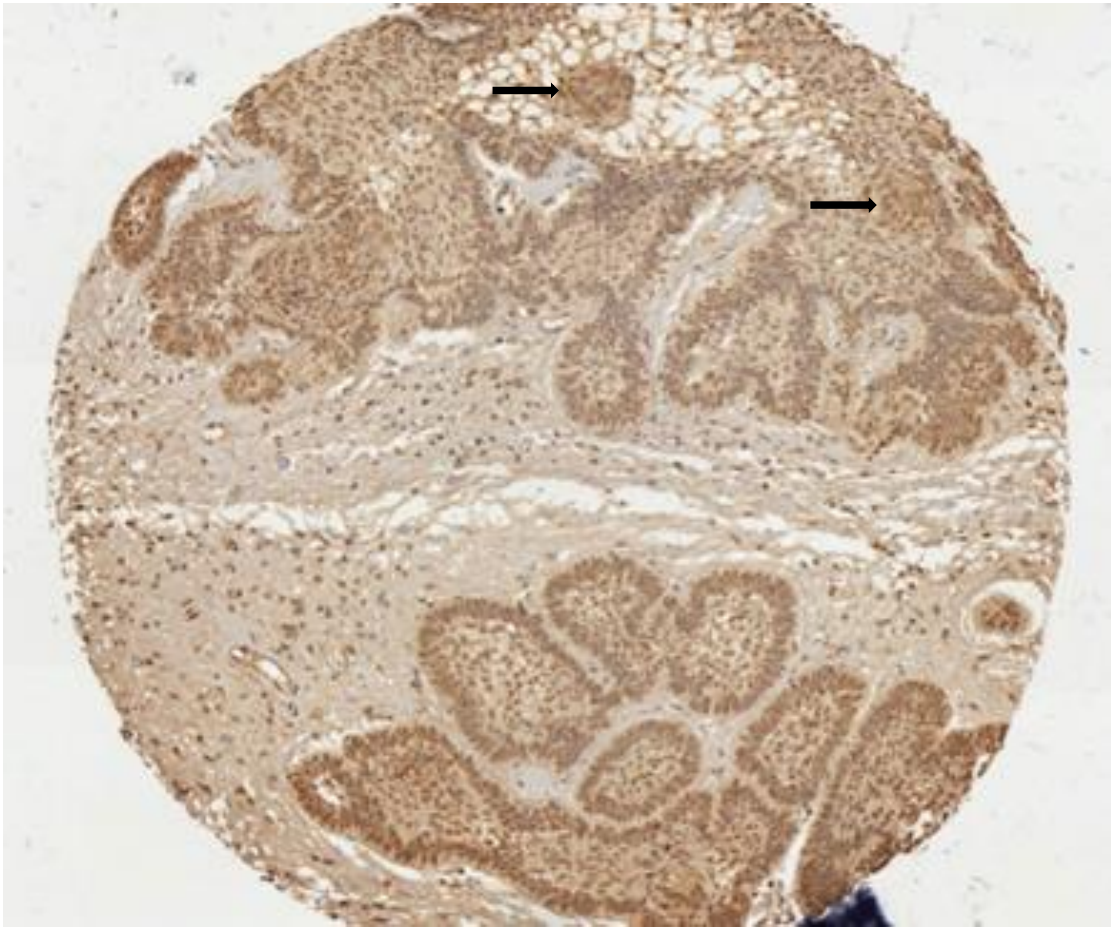


**Figura 9a:** Inmunorreactividad a SP en adenohipófisis 40 X

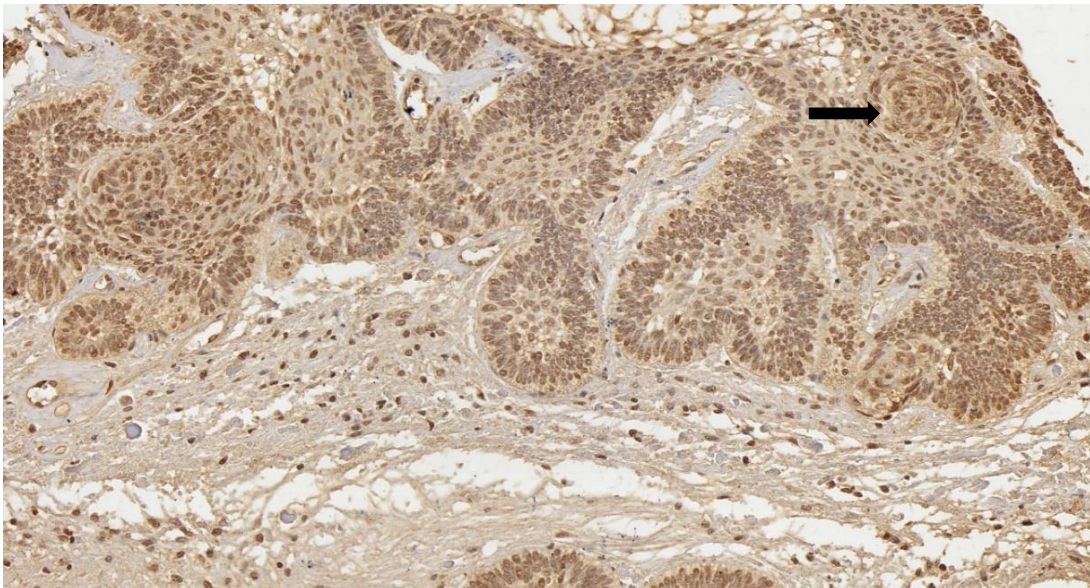
En la **Figura 9a** se observa expresión de SP a modo difuso y poco discriminativo en toda la adenohipófisis. Tiene tendencia a expresarse con mayor intensidad en el núcleo (**punta de flecha**) de la mayoría de las células, pero existen una parte menor de ellas que no se tiñen, mostrando la coloración azulada de la hematoxilina. También es detectable la SP a modo granular en el citoplasma de la mayoría de las células probablemente localizando su expresión en ciertos orgánulos (**flecha**).

En la **Figura 10** se observa distribución de la SP en el CFA con una tinción más marcada en las áreas celulares al tener mayor concentración de núcleos. Notar en la microfotografía, marcados con **flechas**, los nidos de CC con una más marcada expresión de la inmunotinción a SP, aunque sin alcanzar significación estadística ( $p > 0.05$ ) en su intensidad con respecto a otras áreas tumorales. En su cercanía se constituyen las áreas celulares proliferativas del epitelio en empalizada.





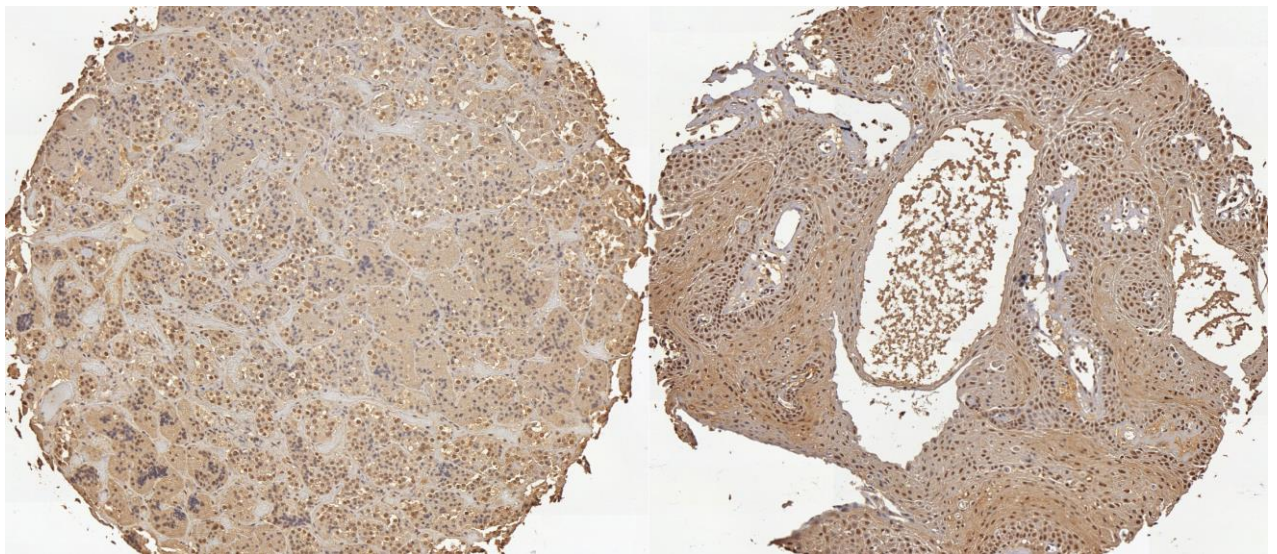
**Figura 10:** Inmunorreactividad a SP en CFA 10X



**Figura 10a:** Inmunorreactividad a SP en CFA 20X

En la **Figura 10a** se muestra aumentada la anterior figura, con las CC marcadas con **flecha**. Se observa la expresión de la SP en los núcleos celulares a modo generalizado y como colorea débilmente la RG, el citoplasma de las células y los intersticios celulares.

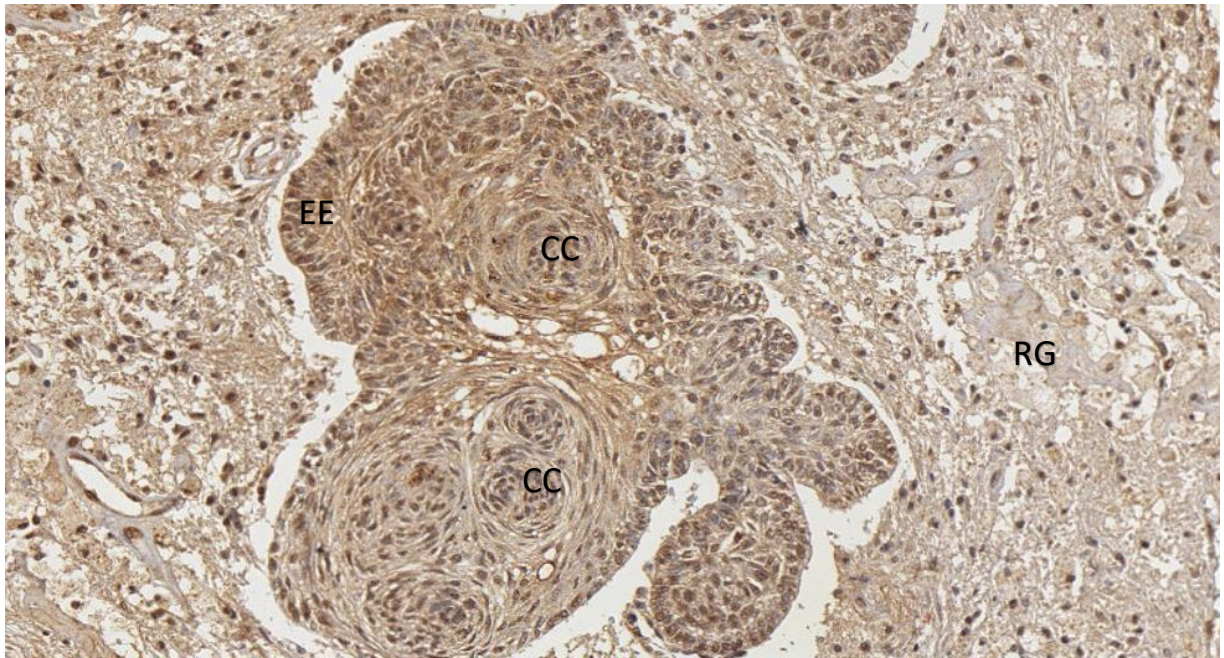
A continuación, en la **Figura 11** se compara la histología tan distinta que presenta la adenohipófisis sana (izquierda) con respecto a la del CFA. Hay que destacar la existencia de una inmunotinción mucho más intensa a SP en el CFA que con respecto a la existente en el tejido adenohipofisario sano.



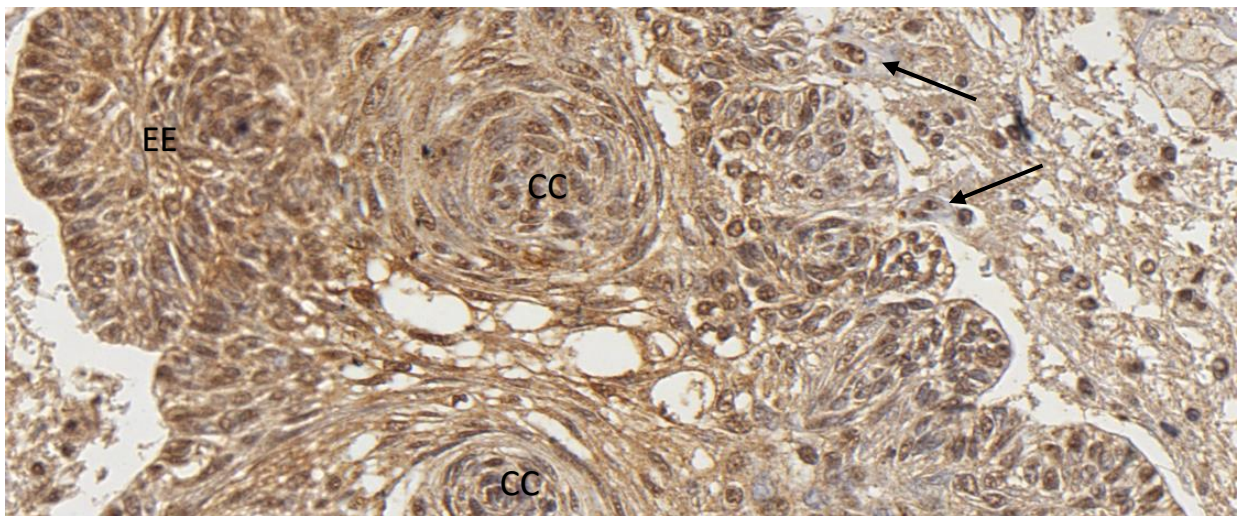
**Figura 11.** Inmunorreactividad a SP en adenohipófisis 10X (izquierda) y CFA 10X (derecha)

En la **Figura 12** destaca la inmunolocalización a SP en cercanía a las Cluster Cells (**CC**) y en el Epitelio en Empalizada (**EE**) donde adquiere la preparación una coloración marrón tabaco más intensa. En la Reacción Glial (**RG**), no existe marcada inmunotinción a SP salvo porque se expresa con mayor intensidad en los núcleos celulares de los componentes celulares de la glía.





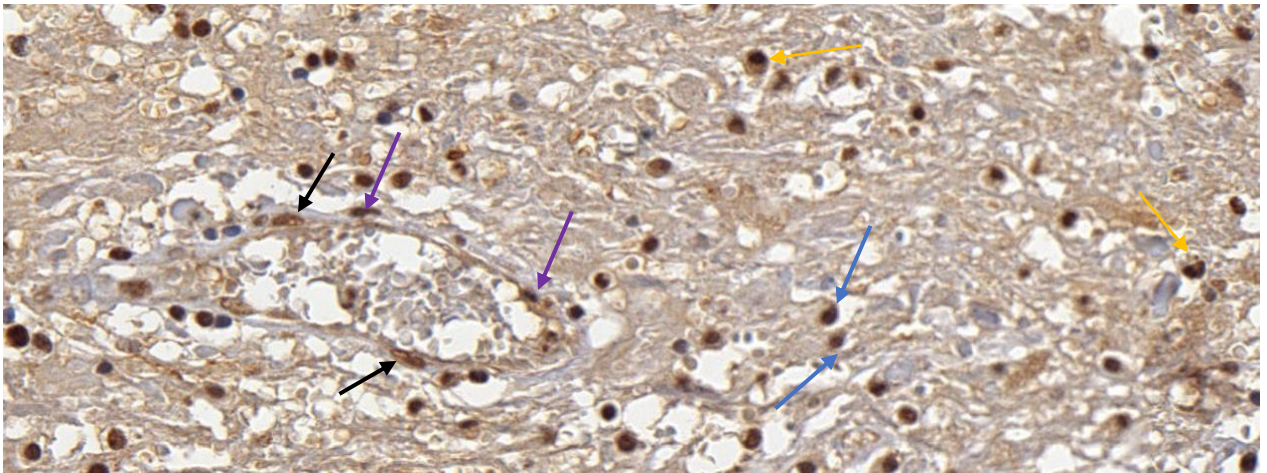
**Figura 12:** Inmunorreactividad a SP en CFA 20X



**Figura 12a:** Inmunorreactividad a SP en CFA 40X

En **Figura 12a** Se muestra con más detalle esa coloración marrón tabaco que indica la inmunorreactividad a SP en la cercanía a las **CC** y al **EE**. Se nota la tendencia de la inmunotinción a SP a localizarse en los núcleos celulares. Se observan como células inflamatorias (**flechas negras**) muestran inmunorreacción a SP en sus núcleos.

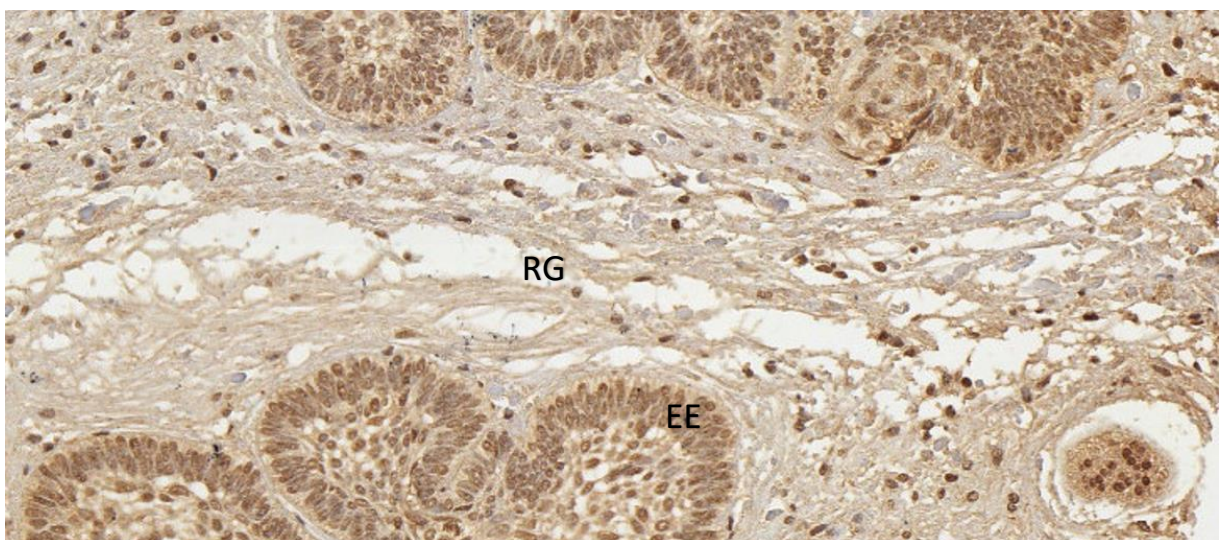




**Figura 13:** Inmunorreactividad a SP en CFA 40X

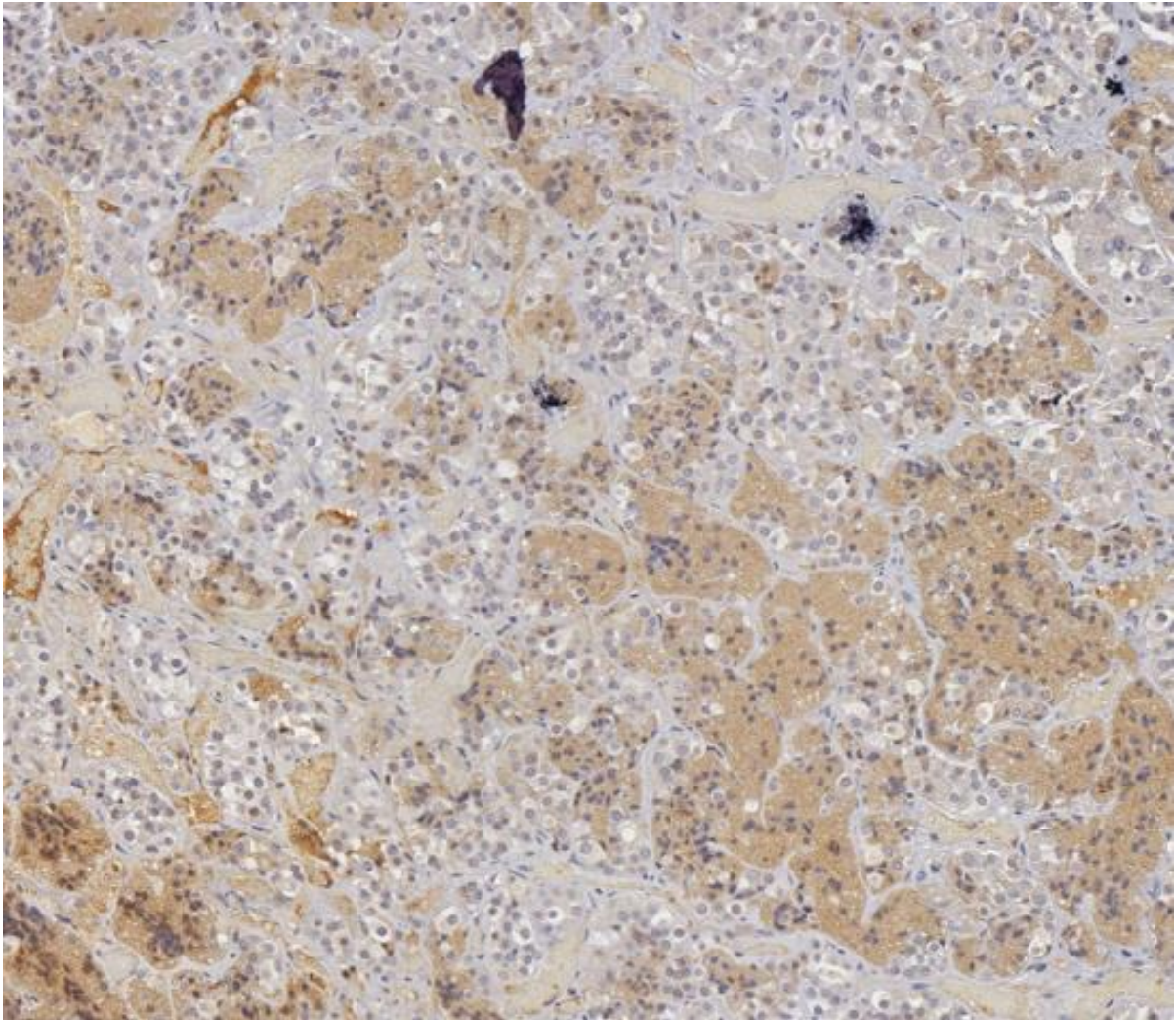
En **Figura 13** se presenta microfotografía en detalle de la RG, que muestra la inmunolocalización de la SP en el núcleo de células endoteliales (**flechas negras**), en fibroblastos (**flechas moradas**), en células gliales (**flechas azules**) y en linfocitos (**flechas amarillas**). En estos dos últimos, se localiza inmunorreactividad a SP con especial intensidad, adquiriendo una muy significativa intensidad en el núcleo y coloreando en parte el citoplasma.

En la **Figura 14** se muestra en microscopía óptica diferentes regiones del CFA con inmunotinción a SP. El **EE** con coloración en los núcleos celulares y la **RG** con su microglía con núcleos resaltados con la inmunotinción a SP.



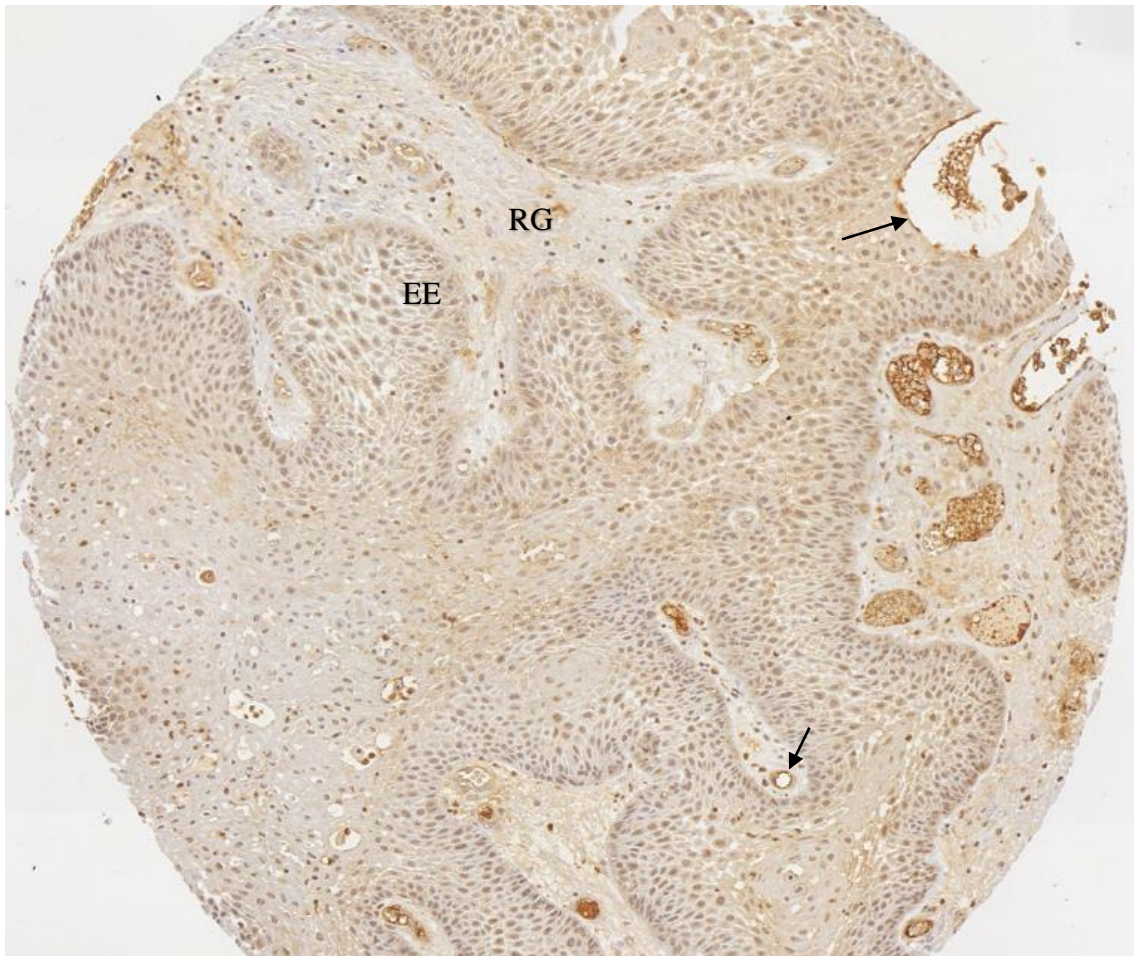
**Figura 14:** Inmunorreactividad a SP en CFA 15X





**Figura 15:** Inmunorreactividad a NK-1R en adenohipófisis 10X

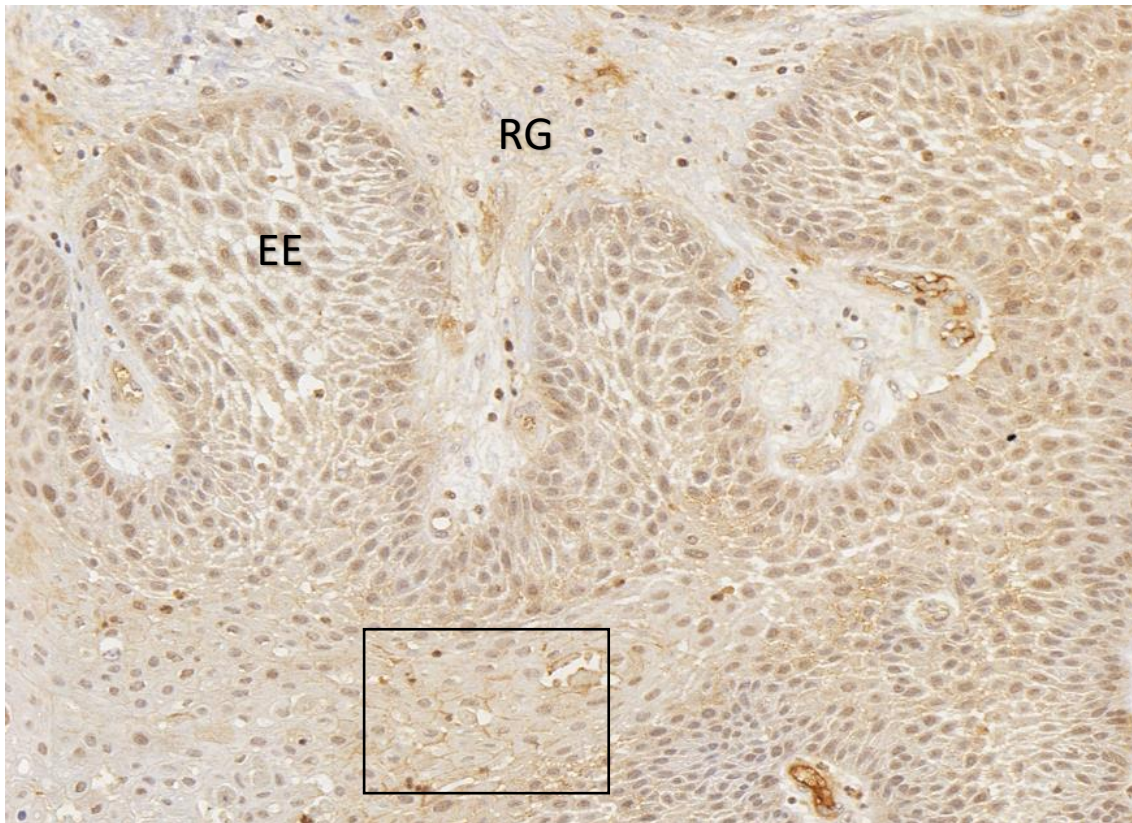
En **Figura 15** se observa expresión de NK-1R en una hipófisis sana. Se tiñen las membranas celulares y el citoplasma de un subconjunto de células del parénquima adenohipofisario. La ausencia de otras tinciones inmunohistoquímicas imposibilita el reconocimiento de cada una de estas poblaciones celulares.



**Figura 16:** Inmunorreactividad a NK-1R en CFA 10X

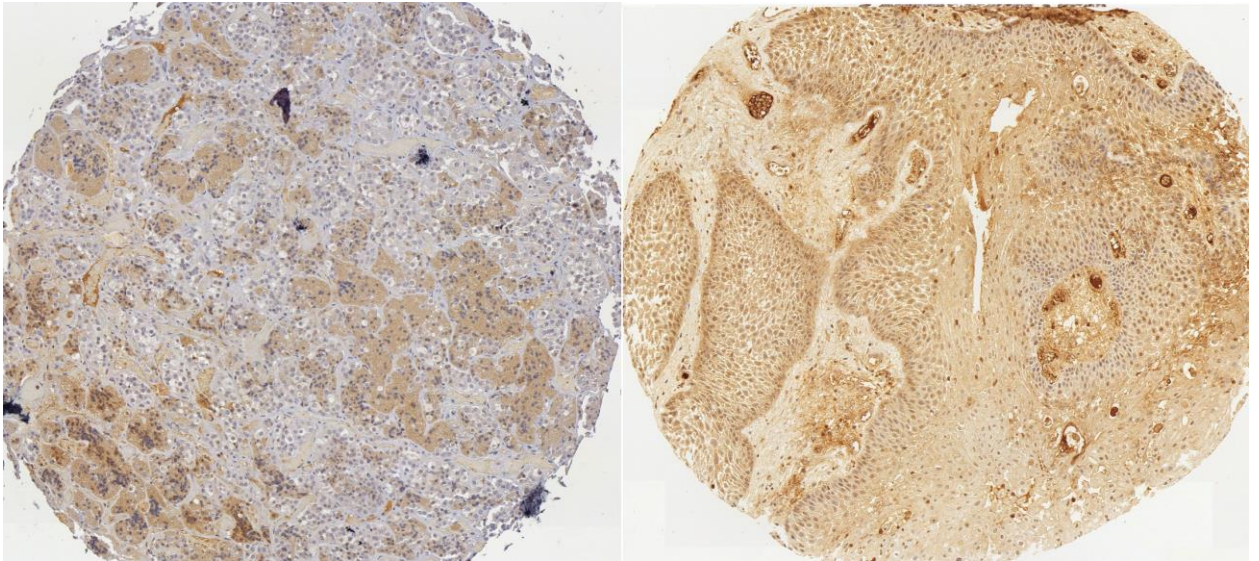
En la **Figura 16** se muestra inmunorreactividad de NK1R en el CFA. Su inmunoexpresión es a modo difuso y con predominio membranocitoplasmático en el **EE**, en las células inmunes asentadas en la **RG** y en el endotelio de los vasos (marcados por **flechas negras**).





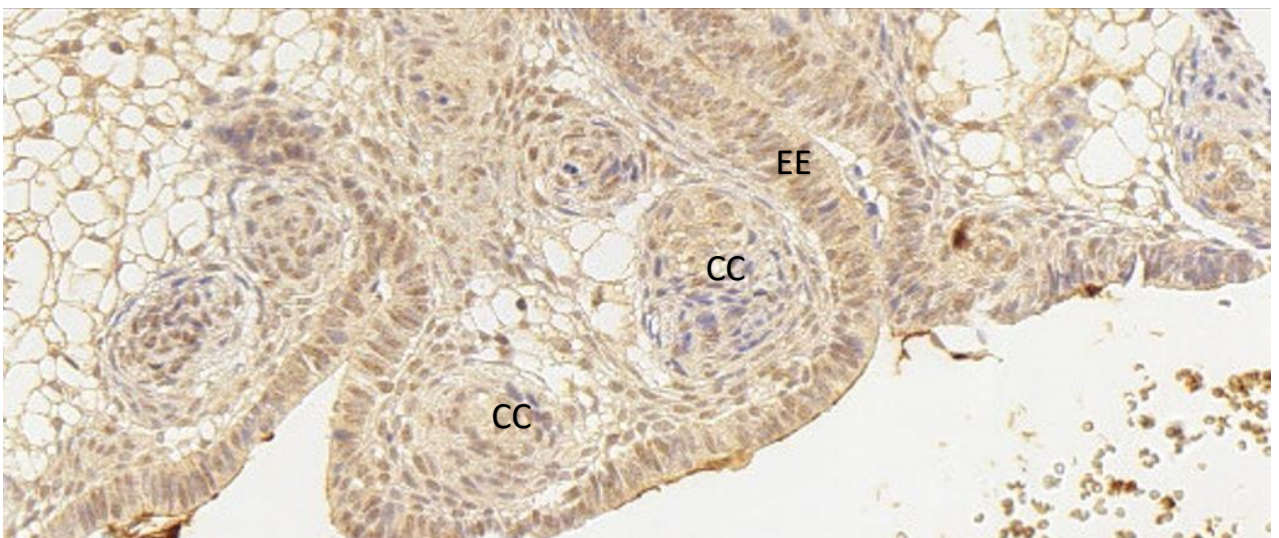
**Figura 16a:** Inmunorreactividad a NK-1R en CFA 20X

En la **Figura 16a**, se muestra la misma región de la figura anterior, pero a un mayor aumento. Véase como en todo el **EE** se insinúan los contornos celulares secundariamente a la inmunoexpresión de NK-1R en la membrana celular (NK-1R es un receptor de membrana). En el área del recuadro, se observan los depósitos de inmunotinción a NK-1R en las regiones basales del **EE** lo que dibuja el contorno de las células. Hay que destacar que en la **RG** se encuentran células inmunes con expresión intensa de inmunotinción a NK-1R en el citoplasma y en los núcleos.



**Figura 17:** Inmunorreactividad a NK-1R en adenohipófisis 10X (izquierda) y CFA 10X (derecha).

En la **Figura 17** se realiza comparación entre la inmunorreactividad a NK-1R en la adenohipófisis (izquierda) y el CFA (derecha). Obsérvese la inmunoexpresión más intensa en el tumor.



**Figura 18:** Inmunorreactividad a NK-1R en CFA 20X

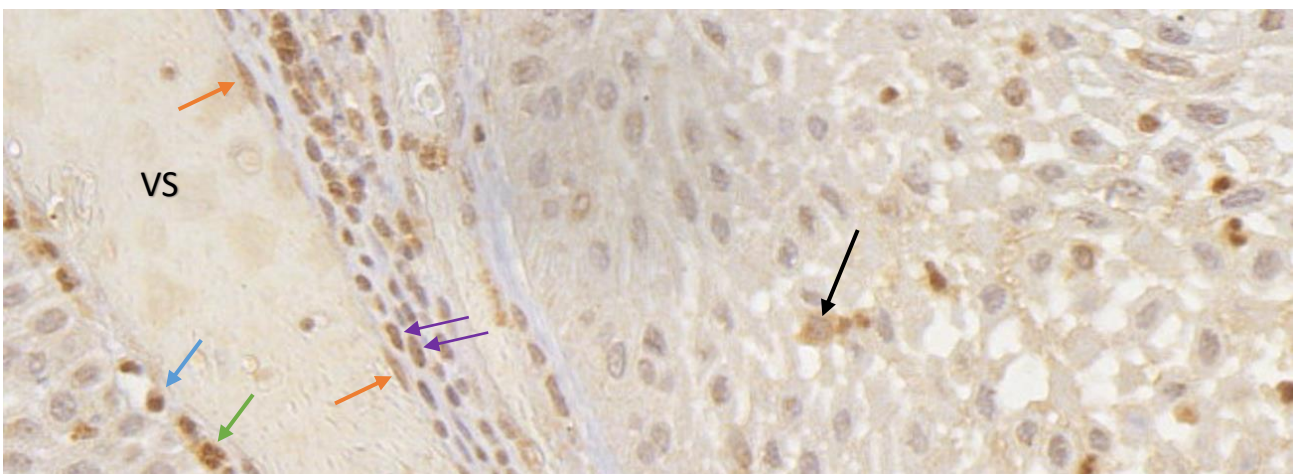


En la **Figura 18** se puede observar que la detección de NK-1R fue también positiva en las **CC**, si bien, fue menos intensa que la existente en el **EE** de la cercanía sin haberse observado diferencias estadísticamente significativas en este aspecto.



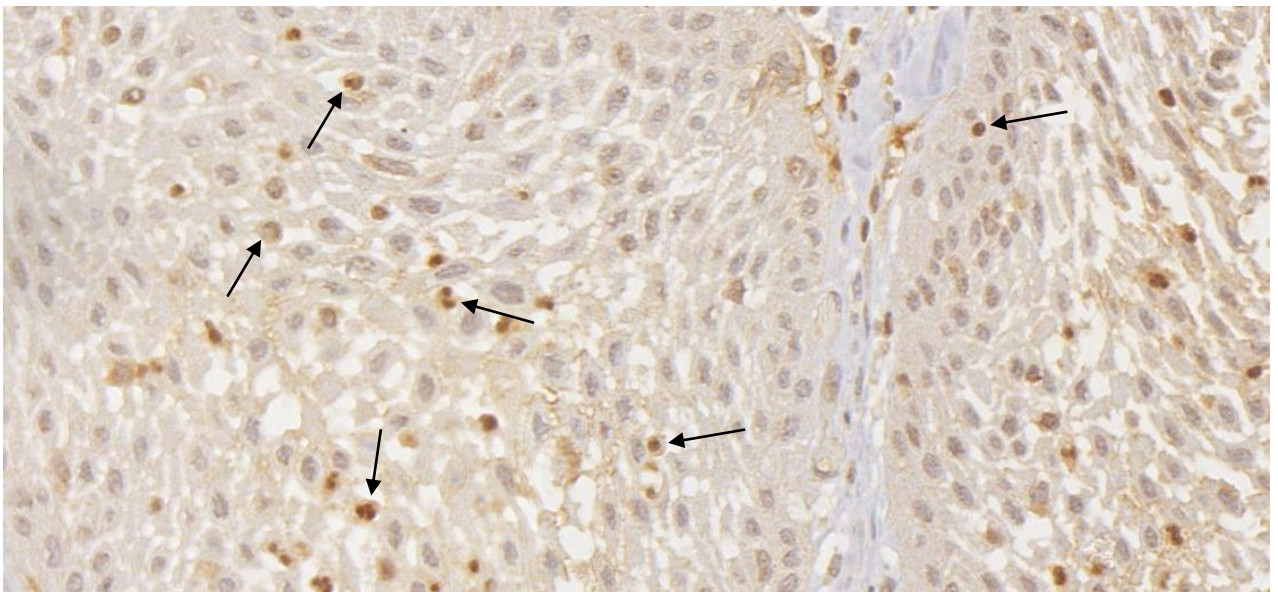
**Figura 19:** Inmunorreactividad a NK-1R en CFA 40X

En la **Figura 19** microfotografía la inmunotinción a NK-1R en la membrana y citoplasma de las células endoteliales de los vasos sanguíneos (**VS**) que perfunden el CFA (**flechas negras**).



**Figura 20:** Inmunorreactividad a NK-1R en CFA 40X

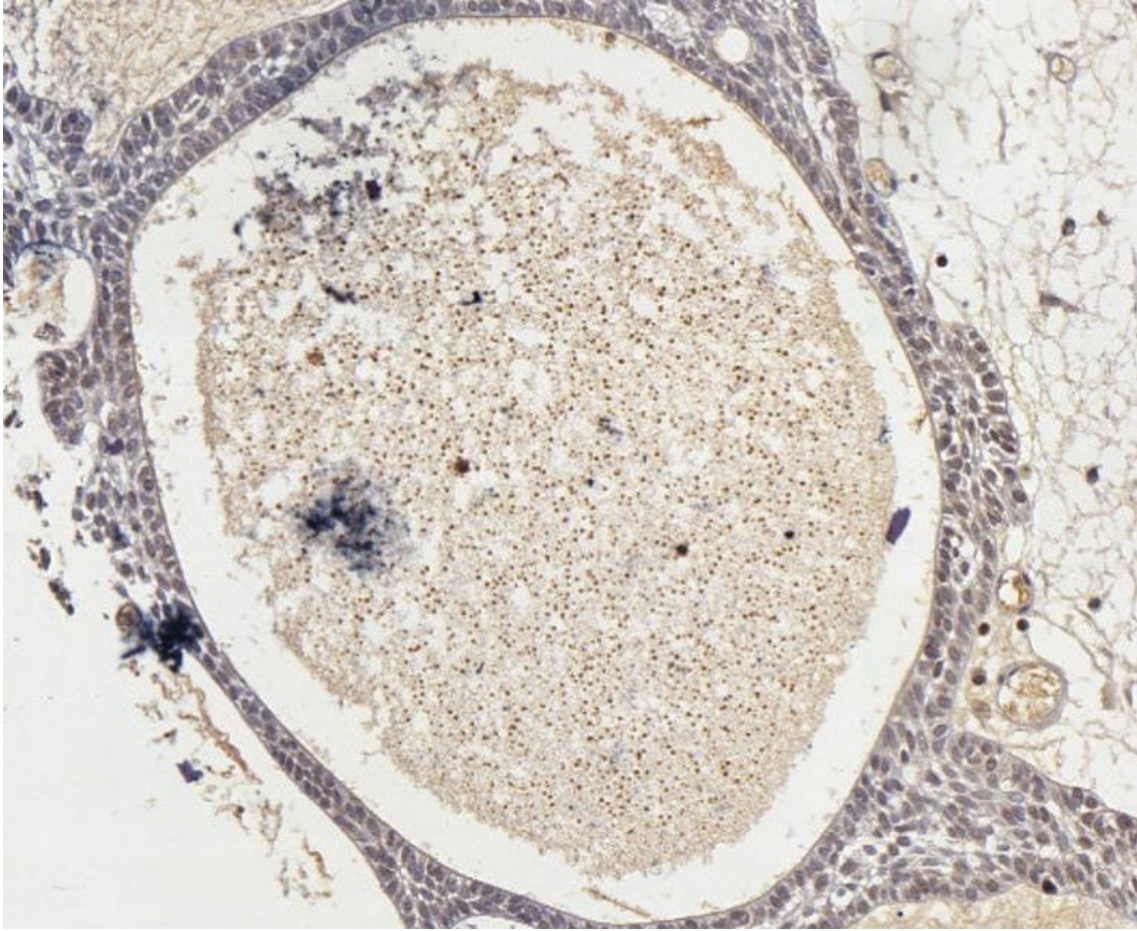
En la **Figura 20**, la microfotografía muestra en detalle la inmunotinción a NK-1R en la pared de un vaso sanguíneo (**VS**). Destaca la inmunotinción a NK-1R que presentan las células endoteliales (**flechas naranjas**) con expresión a nivel del núcleo, citoplasma y de la membrana de las células. En la membrana basal de los vasos sanguíneos se localizan fibroblastos que presentan núcleos y citoplasmas inmunoteñidos a NK-1R (**flechas moradas**). En cercanía, se observan como se están extravasado hacia el tumor células inmunitarias como granulocitos (**flecha verde**) o linfocitos (**flecha azul**) con marcada inmunotinción a NK-1R a nivel de membrana, citoplasma y núcleo. En la cercanía se pueden observar células inflamatorias con expresión de NK-1R (**flecha negra**). El resto de poblaciones celulares supone EE y la expresión de NK-1R es escasa, primando la tinción con hematoxilina y eosina.



**Figura 21:** Inmunorreactividad a NK-1R en CFA 30X

En la **Figura 21** se muestra una sección del CFA. Llama la atención como la inmunotinción a NK-1R es importante en las células del sistema inmune, tiñendo tanto las membranas celulares como el citoplasma y el núcleo, este último con marcada intensidad. Se señalan con **flechas** a las células inmunes. La inmunotinción a NK-1R en la RG acompañante, fue superior a la presente en otras áreas del tumor con significación estadística ( $p < 0.01$ ). Obsérvese el resto de las poblaciones celulares, que suponen el frente de avance del EE, como tienen una tinción hacia NK-1R muy escasa.

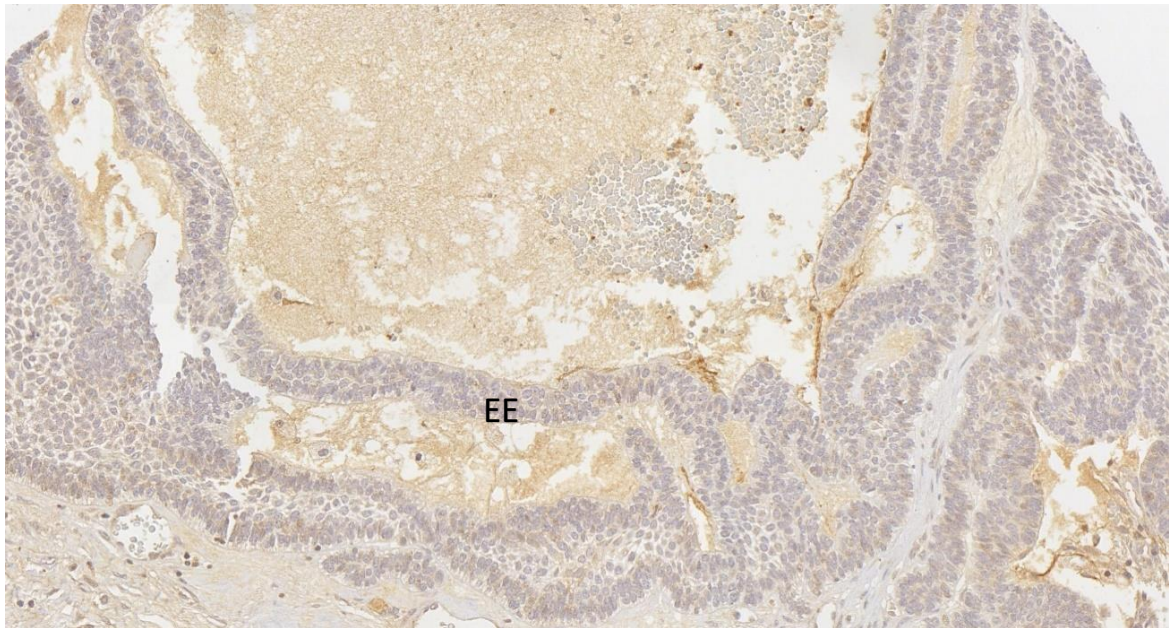




**Figura 22:** Inmunorreactividad a NK-1R en CFA 15X

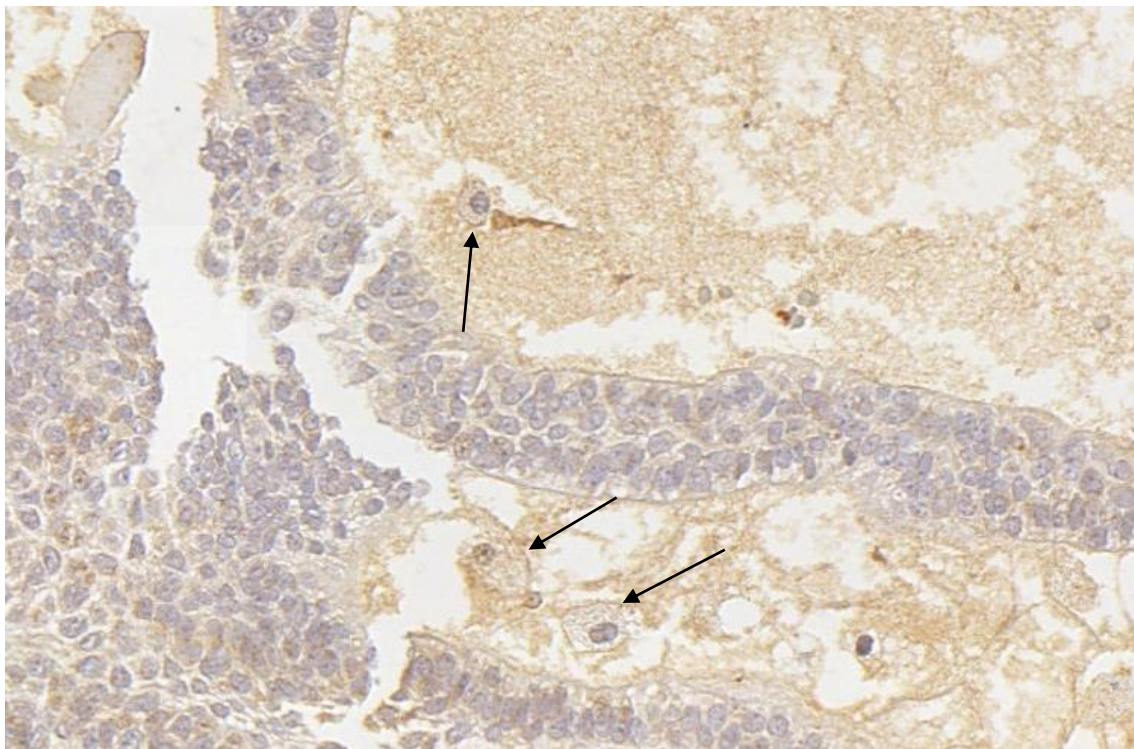
En la **Figura 22** se presenta la inmunotinción a NK-1R en un quiste del tumor. Destacar el magma repleto de células inflamatorias con una importante expresión de la inmunotinción a NK-1R en los núcleos de dichas células.





**Figura 23:** Inmunorreactividad a NK-1R en CFA 20X

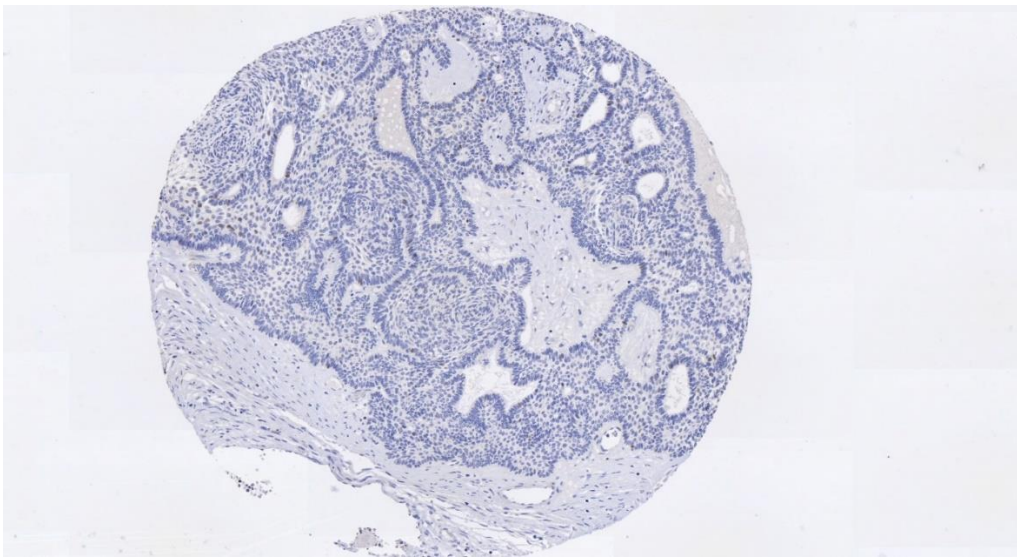
En la **Figura 23** se observa el importante depósito de la inmunotinción para NK-1R en un quiste tumoral. En los citoplasmas de las células del **EE** se observa depósito granular de la inmunotinción a NK-1R.



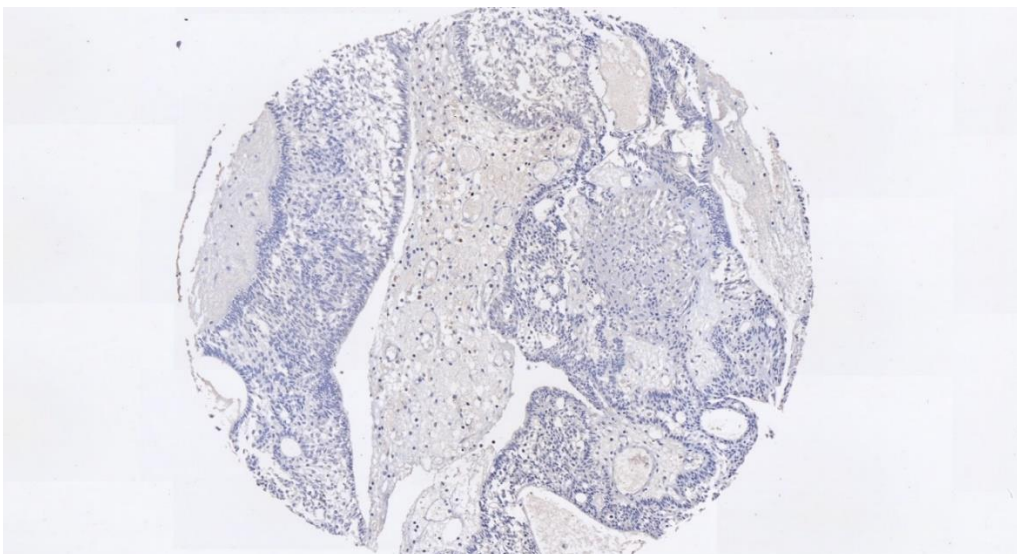
**Figura 24:** Inmunorreactividad a NK-1R en CFA 40X

En la **Figura 24** se puede notar la presencia en un quiste tumoral de células inflamatorias con inmunotinción a NK-1R en la membrana externa y depósitos granulares en el citoplasma de macrófagos (**flechas negras**).

En las **Figuras 25 y 26** se presentan los controles negativos a SP y a NK-1R en CFA. Se observa ausencia de inmunorreactividad y tinción en azul (contratinción con hematoxilina).



**Figura 25:** Control negativo para SP de CFA



**Figura 26:** Control negativo para NK-1R de CFA



## 5. Discusión

La conveniencia de realizar el presente estudio atiende en primer lugar a la dificultad en el tratamiento del CFA, un tumor caracterizado desde hace mucho tiempo<sup>(3)</sup>, pero en el que su tratamiento convencional ha permanecido sin cambios en las últimas décadas<sup>(2)</sup>. Básicamente los principales avances se han producido en el enfoque terapéutico, mucho más conservador e intentando realizar cirugías conservadoras del hipotálamo y al desarrollo de técnicas más conformacionales de radioterapia para disminuir la toxicidad de la técnica<sup>(2,5,8,44)</sup>.

Gracias a los avances en los últimos años acerca de la biología molecular del CFA, hemos podido conocer la existencia de un *driver* mutacional en la enfermedad como es la mutación en la Beta-catenina y la existencia de un modelo de desarrollo oncogénico tipo SASP<sup>(59,61,68)</sup>.

Las inasumibles secuelas experimentadas en los enfermos de CFA con una tasa de déficits endocrinológicos de hasta en el 100% de los pacientes y proporcional tasa de obesidad hipotalámica nos debe hacer enfocar la enfermedad desde un punto de vista más conservador y buscar tratamientos médicos que minimicen la probabilidad de daño hipotalámico<sup>(5,27)</sup>.

La búsqueda de dianas moleculares en este tumor adquiere, por ende, una especial importancia. Aunque el evento central de la oncogénesis parece ser la mutación en la Beta-catenina, existe un escaso desarrollo de sustancias inhibidoras de esta vía, ya sea por falta de efectividad o por requerir dosis tóxicas para su inhibición *in vivo*<sup>(1,134)</sup>. Un representante de la inhibición de esta vía puede ser el ácido acetilsalicílico con demostrados efectos en la prevención del cáncer de colon, sin embargo, su potencial terapéutico está por determinar<sup>(135)</sup>.

La búsqueda, entonces, de otros factores involucrados en la progresión del CFA es necesaria. De entre los mediadores oncogénicos con carácter proncogénicos que mayor interés despiertan en el campo de la investigación básica es la SP<sup>(75)</sup>.

Se ha descrito la existencia de la SP y de su receptor NK-1R en una amplia variedad de tumores y se ha demostrado el efecto trófico de la SP sobre el tejido celular y cómo el

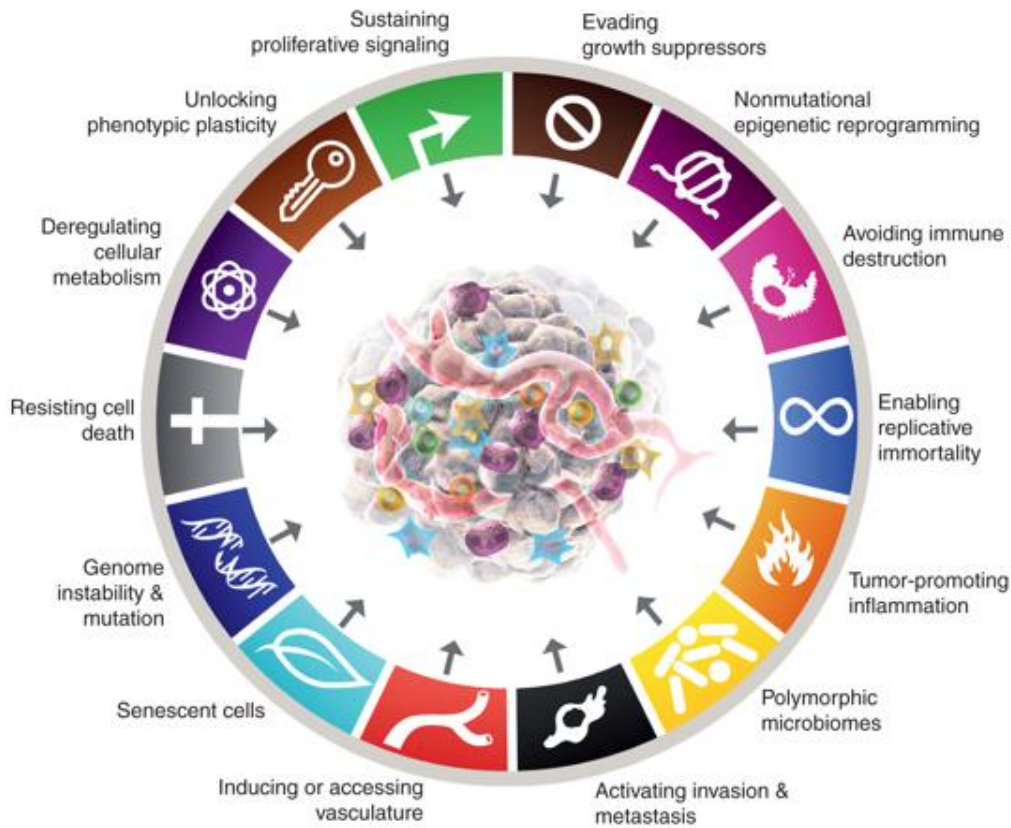


bloqueo del receptor NK-1R causa el paro mitótico y la entrada en apoptosis de diversas líneas de cultivos celulares tumorales<sup>(133)</sup>.

Este trabajo aporta como novedad la inmunolocalización de la SP y de su receptor NK-1R en el CFA, hecho nunca antes demostrado (con fecha de 12 de abril de 2023 consultada la base de datos PubMed, no existe ningún artículo publicado con las siguientes palabras claves, craniopharyngioma, substance P OR Neurokinin-1 receptor). Nosotros describimos aquí por primera vez la inmunolocalización a SP y a NK-1R en el CFA humano. Esto viene determinado por la especificidad de los anticuerpos utilizados, así como los controles de calidad realizados, al obviarse los primeros anticuerpos específicos a SP y NK-1R, se observa una ausencia total de inmunotinción, así como una tinción azul de todo el CFA estudiado, esto es debido a la contratinción con hematoxilina (**Figura 25 y 26**).

Secundariamente, la existencia del binomio SP/NK-1R en el CFA predice la existencia de algún tipo de papel en el mantenimiento y crecimiento de este tumor. Basándonos en estudios previos que han demostrado el efecto potenciador oncogénico en diversos tumores, se deduce que la SP pueda actuar también como un mensajero trófico en el CFA<sup>(77,113)</sup>.

Con la progresiva profundización en la oncología molecular, se ha observado la existencia de múltiples vías de crecimiento y mitogénesis de las células cancerosas, existiendo vías celulares cuya activación supone un efecto esencial para el mantenimiento de la célula tumoral y basta el truncar esta vía para provocar la muerte de la célula tumoral. Estos son los llamados mecanismos génicos de adicción oncogénica<sup>(103)</sup>. El bloqueo de la vía de señalización SP/NK-1R podría consistir en un mecanismo no génico de adicción oncogénica. En modelos sobre cultivo celular y xenoinjertos, ha conseguido la involución mediante la administración de antagonistas de NK-1R sin añadirse otros compuestos<sup>(79,119)</sup>. Queda por comprobar si su efecto clínico confirma la correspondiente efectividad demostrada en los modelos preclínicos. Sin embargo, ha sido publicado un caso clínico de un paciente con cáncer de pulmón no microcítico en tratamiento con radioterapia paliativa y uso compasivo del fármaco antagonista del NK-1R aprepitant (fármaco usado para las náuseas y vómitos post quimioterapia) que tras 45 días de tratamiento con aprepitant a 1140 mg/día alcanzó remisión completa. Además, su administración no causó efectos secundarios graves, de hecho, el paciente se encontraba con excelente estado funcional, aumento de peso y sin alteración analítica<sup>(136)</sup>.



**Figura 27:** Procesos oncogénicos involucrados en el mantenimiento y progresión del cáncer. Tomado de Hanahan D. *Hallmarks of Cancer: New Dimensions*. *Cancer Discov.* 2022 Jan;12(1):31-46.

La trascendente complejidad de la célula tumoral con su infinidad de vías de activación hace que los elementos con demostrado efecto de adición oncogénica sean escasos y el crecimiento de la célula tumoral atienda a razones autónomas, multifactoriales y sinérgicas que se imponen frente a la pérdida de función de los mecanismos de retroalimentación negativa ejercidos por los genes supresores de tumores, la mitocondria y los mecanismos de silenciamiento epigenéticos. A todo ello es necesario sumar la constante plasticidad y mecanismos de escape que desarrolla la célula tumoral ante señales apoptóticas y de control inmunitario. Es por ello que la cura del cáncer se conseguirá mediante el sumatorio de la inhibición de los diferentes mecanismos de perpetuidad adquiridos por las células tumorales<sup>(137)</sup>.

En la **figura 27** se representa magistralmente en los trabajos de Hanahan la complejidad de mecanismos que permiten el desarrollo y mantenimiento del cáncer.

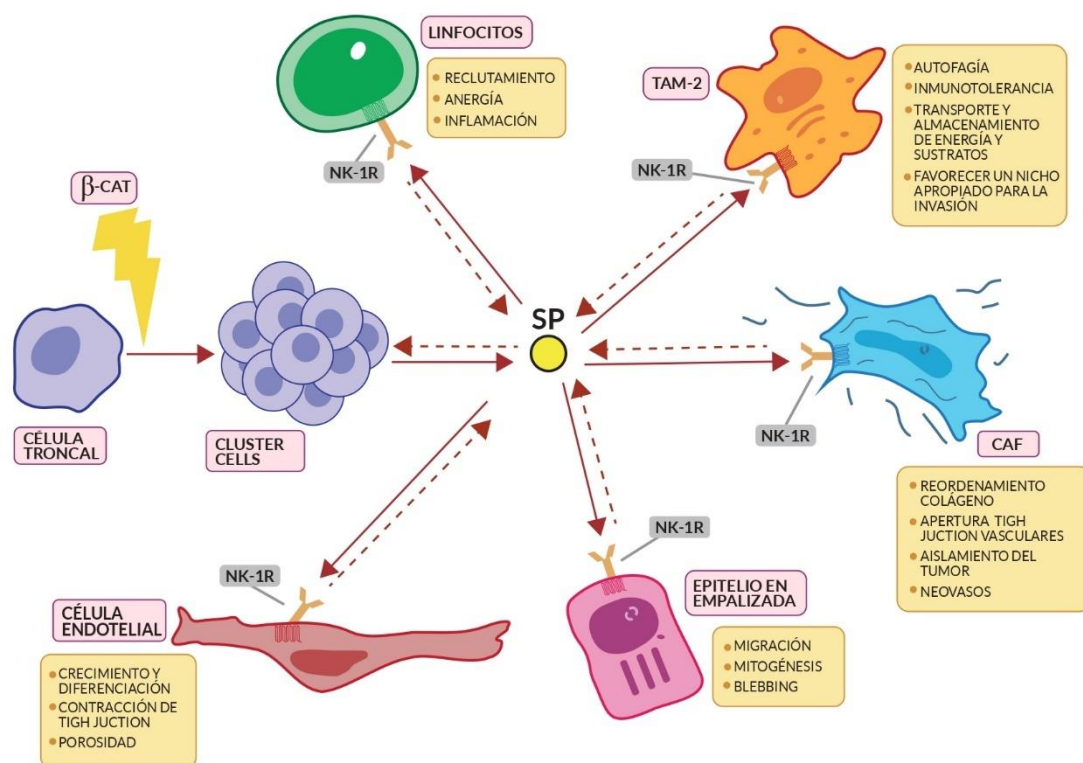
No solo el comportamiento aislado de la célula tumoral caracteriza la agresividad y resistencia al tratamiento que condiciona a ciertos tumores. La instauración de un órgano especializado integrado por el conjunto de células cancerosas compone el denominado MAT y es responsable del comportamiento distinto del cáncer en un organismo del que presenta en los modelos murinos o celulares. Un tumor sólido muestra diversos grupos celulares y una histología diferenciada y especializada que permite un comportamiento independiente al individuo que lo aloja. Existe neovascularización con existencia de vasos sanguíneos particulares con amplias fenestraciones que permiten el transporte de sustancias y células que consigan satisfacer la demanda metabólica del tumor y su diseminación a través de la circulación sanguínea o linfática. El comportamiento del sistema inmune en el tumor es también particular con la existencia de un trasfondo anérgico, sino que además se comporta la propia inflamación como un factor trófico para el cáncer. Además, el proceso de reorganización de la matriz celular es particularmente lábil permitiendo la ausencia de compartimentación de los diferentes grupos celulares y promoviendo su migración<sup>(138)</sup>.

La extrema complejidad del microambiente tumoral sienta las bases de la necesaria orquestación del tumor por diversos mecanismos reguladores. Así, la SP podría ser un intermediario relevante para la progresión del cáncer ya que actuaría no solo sobre la progresión tumoral sino sobre la reacción inflamatoria tumoral<sup>(117)</sup>.

A pesar de la evidencia básica que existe acerca del proceso tumoral asociado a la SP, otras vías de activación oncogénicas han sido investigadas de manera más profunda. Precisamente, la SP regula diversas vías mitogénicas de la célula tumoral como la vía MAPK<sup>(106)</sup>, WNT<sup>(112)</sup> y la AKT<sup>(107,129)</sup>, que tienen un marcado papel como genes de adicción oncogénicos en CFA, gliomas o en la histiocitosis de células de Langerhans entre otros. También es destacada su influencia como potenciador del efecto Warburg, en la angiogénesis y en la mesenquimización de la célula tumoral. Así el bloqueo de NK-1R puede suponer un efecto paninhibidor para el desarrollo del cáncer<sup>(75)</sup>.

En el caso particular del CFA, el hecho de existir poblaciones celulares tan diferenciadas y una marcada heterogeneidad tisular, la existencia de un modelo de SAPS como mecanismo conductor parece acertado y la existencia de una población de CSC con un fenotipo SASP que mantenga por mecanismo señalizadores la progresión del tumor es una hipótesis más que interesante y bien argumentada propuesta por el Dr. Martínez-Barbera y su equipo<sup>(4,59,61,62,66,68,69,139)</sup>.

La existencia de SP y de NK-1R en el CFA, como se deriva de este trabajo, es compatible dentro del modelo de SASP arriba comentado y actuar como un sistema mensajero autocrino, paracrino y endocrino producido por las CSC que componen las CC que permite potenciar el crecimiento y diferenciación de otras poblaciones del grueso del MAT. Así las CSC producirían la SP que sería generada hacia el espacio extracelular y se uniría a los receptores NK-1R que se encuentran en la membrana de las células del microambiente tumoral (fibroblastos, macrófagos y células endoteliales) como se ha demostrado en este trabajo. Se presenta en **Figura 28** el esquema del modelo oncogénico dirigido por la SP en el CFA.



**Figura 28:** Modelo oncogénico dirigido por la SP en el CFA

La **Figura 28** representa la hipótesis sobre la que se basa el estudio: a la izquierda, una célula troncal sufre una mutación *driver* que permite la translocación de la Beta-catenina ( $\beta$ -CAT) al núcleo celular con la consiguiente activación de la maquinaria mitogénica y el establecimiento de una población clonal con Beta-catenina mutada denominada Cluster Cells. Esta población genera SP que actúa como un señalizador dentro del MAT con efectos autocrinos, paracrinos, intracrinos (nucleocrinos) y endocrinos. Tras la unión de la SP a su receptor NK-1R se producirían estímulos oncogénicos sobre las diferentes poblaciones presentes en el MAT. Sobre Linfocitos induce su anergia, fomenta el

reclutamiento de poblaciones reguladoras y el mantenimiento de señales tróficas e inflamatorias. Sobre la población de Macrófagos Asociados a Tumores tipo-2 (TAM-2) propiciaría la autofagia para la eliminación de detritus que puedan resultar tóxicos en el nicho tumoral como proteínas alteradas, fármacos o metabolitos fruto de la anoxia o la radioterapia. Se evitaría igualmente la presentación de antígenos tumorales mediante los complejos mayores de histocompatibilidad a los linfocitos. Otro punto importante supondría el estímulo anabólico para el acúmulo de colesterol y glucógeno por medio de macrófagos espumosos o en los quistes ricos en lípidos que caracterizan al tumor y que surtirían al mismo de la energía necesaria para su crecimiento. En cuanto a los Fibroblastos Asociados a cáncer (CAF) que se localizan en el tumor, la SP podría inducir una reorganización esencial en el colágeno que permitiera la movilidad del conjunto celular y el aislamiento del tumor de las amenazas inmunes o tóxicas procedentes del organismo. Igualmente, los CAF serían necesarios para generar las membranas basales de los neovasos que se generen en el MAT. En cuanto a las acciones sobre el Epitelio en Empalizada, la SP promovería la mitosis en el mismo, su deformación y migración que permita la invasión de estructuras vecinas. Sobre las Células Endoteliales, la SP promovería su crecimiento, multiplicación y la porosidad de los neovasos que permita la entrada en el microambiente de nutrientes, células mesenquimales y células inflamatorias que continúen haciendo crecer el MAT.

La SP se ha demostrado distribuida de modo generalizado en las muestras de CFA incluidas en el estudio. Su expresión ha sido poco discriminativa y no ha sido estadísticamente significativa su mayor expresión en ninguna región tumoral de manera particular. Observando las muestras, la SP se muestra más presente en las áreas con mayor concentración celular, aunque en regiones menos celulares, también se ha expresado la SP. Este hecho hipotetiza que la SP cumple un papel relevante en el desarrollo del CFA.

De manera evidente, se ha observado en este trabajo una mayor intensidad para la SP en el CFA con respecto a la hipófisis sana. Este hecho se encuentra representado en la **Figura 11**. La mayor intensidad en la inmunolocalización de la SP en tumores que con respecto a sus tejidos de origen está ampliamente descrita en la literatura y sirve como hipótesis al papel regulador de la SP en los procesos de desarrollo oncogénico<sup>(75)</sup>.

En la presente tesis se observa, como en trabajos anteriores, una distribución de la SP en el citoplasma y el núcleo celular. Como se ha valorado en trabajos previos, su implicación en procesos relacionados con el DNA es probable<sup>(78,102,113)</sup>. Su expresión a modo granular

en el citoplasma ha sido descrita en otros tumores como de colon o de estómago y tratarse de depósitos intracelulares del péptido aunque actualmente se desconoce su función<sup>(140)</sup>.

La SP se encuentra igualmente expresada en los leucocitos presentes en el tumor, tanto en linfocitos como en macrófagos, por lo que las funciones de la SP en el craneofaringioma no solo podrían limitarse a efectos paracrinos de crecimiento tumoral, sino que contribuirían al entorno inflamatorio que acompaña al craneofaringioma y que recluta gran cantidad de células inmunitarias sin conseguir una respuesta inmunitaria efectiva contra el tumor, al contrario, el contexto inflamatorio tiene un papel de potenciación oncogénico. De hecho, ha sido ampliamente descrito el papel de la SP en los fenómenos proinflamatorios y los trabajos previos coinciden en un efecto inmunosupresor a altas concentraciones. Esto es debido a que desata una respuesta inflamatoria significativa aunque no eficaz<sup>(141-143)</sup>. Una de las líneas de investigación más interesantes actualmente en este tipo de tumor sería la inmunoterapia. Se conoce que en las células inflamatorias como linfocitos y macrófagos, la SP al unirse al NK-1R de dichas células produce un aumento en la concentración y los niveles de IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$ <sup>(94)</sup>. Existe evidencia de que el bloqueo de la IL-6 es útil para inhibir la reacción inflamatoria desencadenada por el tumor y que fomenta el desarrollo de los grandes quistes que acompañan al mismo<sup>(52)</sup>.

Por otro lado existen trabajos que se basan en fomentar la respuesta inmune contra los antígenos tumorales a través del bloqueo PD-1/PD-L1<sup>(144)</sup>. Aprepitant (antagonista de NK-1R) ha demostrado disminuir los linfocitos T CD4+ PD-1+<sup>(145)</sup>. Así el bloqueo de NK-1R sería otro modo de administrar inmunoterapia para este tipo de cáncer porque podría actuar a la vez sobre el proceso tumoral, el proceso inflamatorio y el proceso inmunosupresor desencadenado por las células tumorales<sup>(146)</sup>.

La presencia de la SP y el NK-1R en la población endotelial es otro hecho destacable. El rol de la SP como proangiogénico es un hecho muy estudiado en diversos tumores<sup>(75,79)</sup>. La generación de neovascularización es uno de los pilares que sustentan la oncogénesis de tumores sólidos y permite garantizar la llegada de nutrientes y la diseminación tumoral<sup>(147)</sup>. Además de las funciones comentadas, los neovasos presentan una particular estructura que facilita la llegada de células mesenquimales y células T reguladoras que potencian la anergia del MAT de los tumores sólidos<sup>(148,149)</sup>. En este dual mecanismo de la angiogénesis e inmunoanergia se erige el VEGF como un mediador fundamental<sup>(150)</sup>. Interesantemente, se ha demostrado que la SP regula el VEGF<sup>(151)</sup>. En este estudio se

observa en el endotelio tumoral un aumento de la expresión a SP y a NK-1R por lo que el descrito rol angiogénico de la SP se mantendría también en el caso del CFA.

En este trabajo se demuestra la existencia de NK-1R en el CFA y su mayor expresión con respecto a la hipófisis sana como se observa en la **Figura 17**. Esto va en concordancia con otros estudios descriptivos en los cuales se demuestra mayor existencia de NK-1R en los tumores con respecto a sus tejidos de origen y la intensidad de su expresión es mayor cuanto más alto sea su grado de malignidad histológica<sup>(75,77)</sup>.

Con respecto a la distribución del receptor NK-1R, éste se distribuye de una manera mucho más discriminativa en las muestras de CFA. Existe una distribución estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) a nivel de la RG del CFA con respecto a otras regiones del tumor. En este tejido se asientan en su mayoría células inflamatorias.

Se ha detectado una llamativa expresión del NK-1R en el núcleo de las células inflamatorias existentes en el tumor, mayoritariamente asentadas en la RG. A pesar de que el NK-1R es un receptor de membrana y se encuentra en la superficie externa de la célula, puede encontrarse en el citoplasma por fenómenos ubiquitinizadores mediados por la  $\beta$ -arrestina.

La detección de NK-1R en el núcleo celular es un fenómeno infrecuente pero que puede observarse en células muy activas metabólicamente. Sin embargo, su expresión en el núcleo de las células tumorales es difícil de observar debido a que expresan la forma truncada del receptor que persiste en la membrana celular y no puede ser internalizado por la célula hacia el citoplasma ni expresarse por tanto en el núcleo<sup>(130)</sup>.

El hecho del aumento de la expresión de NK-1R en los leucocitos y células endoteliales parece muy interesante ya que la existencia del receptor de la SP en estas células determina que el péptido cumpla una función de mensajero, transmitiendo una señal trófica e inflamatoria sobre la reacción glial que acompaña al tumor. La SP potenciaría como en otros tumores previamente estudiados, un efecto angiogénico, inflamatorio y de reorganización del lecho glial permitiendo el característico desarrollo de todo el MAT que acompaña al CFA<sup>(4,6)</sup>.

La reorganización de la matriz colágena es un aspecto del MAT que está despertando el interés de las investigaciones oncológicas. Dentro de la matriz tumoral (RG en el caso del CFA) existen células gliales que facilitan la invasión regional por parte del tumor<sup>(60)</sup>. Este hecho es relevante en el contexto del CFA, un cáncer con marcada agresividad regional

y alta tasa de recurrencia local. Hemos observado un aumento de expresión de la SP y el NK-1R en células gliales del CFA con lo cual la SP podría estar regulando la invasión regional de este tipo de tumor.

En los últimos años se ha puesto de relevancia el papel de los TAM para el mantenimiento y generación del MAT<sup>(64)</sup>. En el actual estudio se observa como células inmunes (linfocitos, macrófagos y células gliales) del CFA sobreexpresan SP y NK-1R, con lo cual la SP pudiera actuar como un péptido diferenciador de las poblaciones TAM-2 que promuevan la anergia inmune y liberen metaloproteasas capaces de reordenar la matriz colágena y permitir el frente de avance del epitelio en empalizada del CFA <sup>(151)</sup>.

Aunque por lo general se ha demostrado que el contenido de colesterol de los tejidos tumorales es superior al de los tejidos sanos, es llamativa la acumulación de colesterol que experimenta el CFA, hasta tal punto que los quistes y hendiduras ricas en colesterol consisten en uno de los hallazgos guía para su diagnóstico patológico. Tal rica presencia de colesterol puede estar involucrada en la anergia característica del tumor a pesar de su contexto inflamatorio. Se ha demostrado que el colesterol produce anergia de los linfocitos T CD8+ y que los antagonistas del colesterol causan reactividad inmune. Igualmente el colesterol promueve una diferenciación monocitaria hacia TAM-2 que fomenta la inmunotolerancia<sup>(152)</sup>. En nuestro trabajo se han observado quistes en el CFA, aunque debido a la preparación histológica, no podemos asumir que contuvieran colesterol. Sin embargo, se ha observado reacción inmune en estos quistes.

Parece que la interacción entre los TAM y los acúmulos de colesterol presentes en el CFA debe de ser intensa. El origen de estas balsas de colesterol puede provenir de la fagocitosis de la mielina de los tejidos gliales que invade el tumor. Una de las funciones de los TAM es el reordenamiento y eliminación de detritus del nuevo nicho tumoral. La importante reserva de colesterol en lugar de su metabolización, puede estar orientada al almacenamiento de energía y recursos para la supervivencia de las células tumorales, permitiéndoles obtener energía, generar membranas celulares y microvesículas, que en última instancia se usen para alargar la vida media y mejorar la difusión de moléculas señalizadores tales como la SP. El colesterol también induce la generación de factores oncogénicos como Wnt, Shh, Yap, TGF- $\beta$ , VEGF o MMP y previene la apoptosis desencadenada por la mitocondria<sup>(153)</sup>. Interessantemente estas moléculas y sus correspondientes vías están reguladas a su vez por SP<sup>(133)</sup>.



Queda por determinar en este estudio si la SP está generada por las CC como mecanismo paracrino regido por unas CSC en estado senescente. Para ello es necesario en el futuro llevar a cabo técnicas de microdissección o de amplificación génica. Sin embargo, la ya comentada mayor intensidad de la SP en las áreas con riqueza celular y la estadísticamente significativa mayor localización del NK-1R en la RG con respecto a otras regiones del tumor puede ser compatible con esta hipótesis.

En el caso del CFA se ha demostrado la hiperactivación de diversas vías oncogénicas como la WNT<sup>(56)</sup> o SHH<sup>(51)</sup>. La SP a través de su receptor acoplado a proteína G, el NK-1R, produce liberación de segundos mensajeros transmitiendo las órdenes mitogénicas a las células del tumor. El modo en que se produce la transmisión intracelular del mensaje oncogénico desencadenado por la SP queda por profundizar en él, siendo necesarios estudios de hibridación e inmunofluorescencia y técnicas de secuenciación<sup>(115)</sup>. El conocimiento más profundo del mecanismo endocelular puede permitir el desarrollo de terapias farmacológicas más específicas y eficaces para el tratamiento del CFA.

Entre las debilidades y sesgos del estudio, debe destacarse, la evidente limitación del estudio por falta de validación en cuanto a la concentración ideal de anticuerpo para SP y NK-1R. Al no existir diluciones predeterminadas, se ha teñido según concentraciones usadas en anteriores trabajos<sup>(78,102)</sup> y posteriormente ajustando según los resultados observados con microscopía. Finalmente se determinaron tinciones de 1/1500 para SP y 1/500 para NK-1R.

El trabajo carece de cotinciones que ayuden a identificar con mayor precisión las poblaciones de CSC y de células receptoras de los estímulos paracrinos. En este sentido las cotinciones contra Beta-catenina o marcadores de troncalidad como OCT4 o SOX2 serían de utilidad. Como justificación, el material de biopsia que se usó para el estudio era escaso y la necesidad de cotinciones habría agotado los *microarrays* tisulares de CFA existentes en banco de tumores.

La expresión para SP en el CFA se ha demostrado generalizada. En trabajos previos, se pone en relevancia, que existe ubicuidad de la SP en todos los tejidos del organismo, cumpliendo vitales funciones fisiológicas para la célula derivadas de su función como mensajero para, auto y endocrino<sup>(77)</sup>. La conclusión que puede derivarse en el presente trabajo es que la SP se encuentra expresada en el CFA y que tiene preferencia para localizarse en el interior de las células y en proximidad a las mismas en el CFA,

presentándose en menor cantidad en las zonas con menor concentración celular. Ya se conoce que la SP se encuentra en el núcleo y citoplasma de las células y que puede encontrarse en cercanía a las células para transmitir señales a modo auto y paracrino<sup>(77,101)</sup>. A causa de su vida media corta, el encontrarlo distante a las zonas celulares es más infrecuente y se halla en concentraciones más pequeñas. Este hecho se debería a su transmisión a través del torrente sanguíneo para cumplir funciones endocrinas. De hecho los pacientes afectos de cáncer tienen aumentados los niveles de SP respecto a individuos sanos<sup>(154)</sup>.

Un factor a considerar, que puede alterar significativamente los resultados que ofrece el estudio es la pérdida de calidad de la muestra a causa del parafinado. Al no tratarse de tumor en fresco o ultracongelado, se ha podido desnaturalizar la SP, ya que se trata de un péptido lábil y con vida media corta. El NK-1R puede igualmente haberse visto alterado. Además, tanto uno como el otro han podido perder afinidad por los anticuerpos de la técnica.

La carencia del trabajo de muestras del tumor en fresco o ultracongelados definitivamente ha empobrecido la calidad del trabajo. El poder trabajar con este tipo de material, hubiera permitido la realización de cultivos celulares y poder comprobar muchas de las hipótesis planteadas. Futuros trabajos podrían desarrollarse en este sentido y realizar estudio sobre cultivo celulares para observar el comportamiento del CFA con la administración de SP y antagonistas de NK-1R. Igualmente se podría comprobar el papel de las CSC y su relación con el sistema SP/NK-1R. Sin embargo, el poder obtener una muestra tan extensa de CFA como la usada para el estudio es costoso debido a la escasa incidencia del tumor y al alto coste de manipular y conservar muestras tumorales en fresco o ultracongeladas, siendo las disponibles en bancos de tumores, por lo general, conservadas en parafina.

La heterogeneidad característica del CFA<sup>(2)</sup> puede afectar directamente a la potencia de los resultados. Hay que recordar que los TMAs consisten en microtomos de material histológico y pueden no representar las áreas más características de la histología del tumor al poder contener grandes regiones quísticas, áreas de necrosis, de sangrado o de gliosis peritumoral. Por ello los resultados obtenidos podrían no reflejar bien la inmunolocalización de la SP y de su receptor NK-1R.

Existen técnicas más modernas y sensibles para detección de la SP y del receptor NK-1R como son las técnicas de amplificación mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa

(PCR). Si bien, el localizar histológicamente a la SP y su receptor, sería necesaria llevar a cabo técnicas de microdissección que serían costosas y podrían acarrear la pérdida de material histológico por no decir la ausencia de cebadores o *primers* comerciales para usar en la PCR.

Cabe comentar que la SP es un péptido perteneciente a la familia de las taquikininas, un grupo de péptidos con funciones neurotransmisoras y gran parecido filogenético entre ellas compartiendo la terminación carboxilo terminal Gli-Leu-Met- NH<sub>2</sub> lo que posibilita que la inmunotinción se fije inespecíficamente a otras taquikininas en lugar de a la SP con exclusividad<sup>(82)</sup>. Sin embargo, la reacción cruzada del anticuerpo usado contra SP contra otros péptidos descrita por el proveedor es escasa: contra Neurokinina-A 0,2%, Endotelina-1 0,2% y Somatostatina 0,3 %.

El método de valoración de la intensidad de la expresión de la SP y del NK-1R se ha determinado por escalas cualitativas ordinales y a modo uniobservacional. Es por ello que la pérdida en la calidad de los datos pueda ser importante. Sin embargo, no existen escalas validadas que marquen los diferentes grados de intensidad en la expresión de los péptidos estudiados. Recordar que, en la práctica clínica habitual, la determinación de SP y NK-1R no se realiza en ninguna enfermedad ni existe consenso acerca de su significación y transcendencia patológica. Se ha intentado suplir las carencias del método de observación con la inclusión de dos TMA por cada tumor incluido en la muestra para minimizar así la heterogeneidad de los resultados. Además, la observación de cada TMA no fue secuencial lo que dificultó el condicionamiento del observador asociado a la valoración de dos observaciones secuenciales del material procedente del mismo tumor.

Adicionalmente, para disminuir los sesgos implicados, se pudo contar con un patólogo con amplia experiencia en la valoración de tumores infantiles y cerebrales. La inclusión de controles positivos y negativos ayudó igualmente a la validación correcta de la técnica y a la disminución de los posibles sesgos.

## 6. Aplicaciones y perspectivas futuras

Este trabajo aporta como novedad la detección por primera vez de la SP y del NK-1R en el CFA y la demostración de su sobreexpresión con respecto al tejido hipofisario sano.

Este descubrimiento plantea diversas hipótesis sobre la potencial función de la SP en el modelo de desarrollo oncogénico del CFA que ha demostrado seguir modelos SASP<sup>(59,68)</sup>.

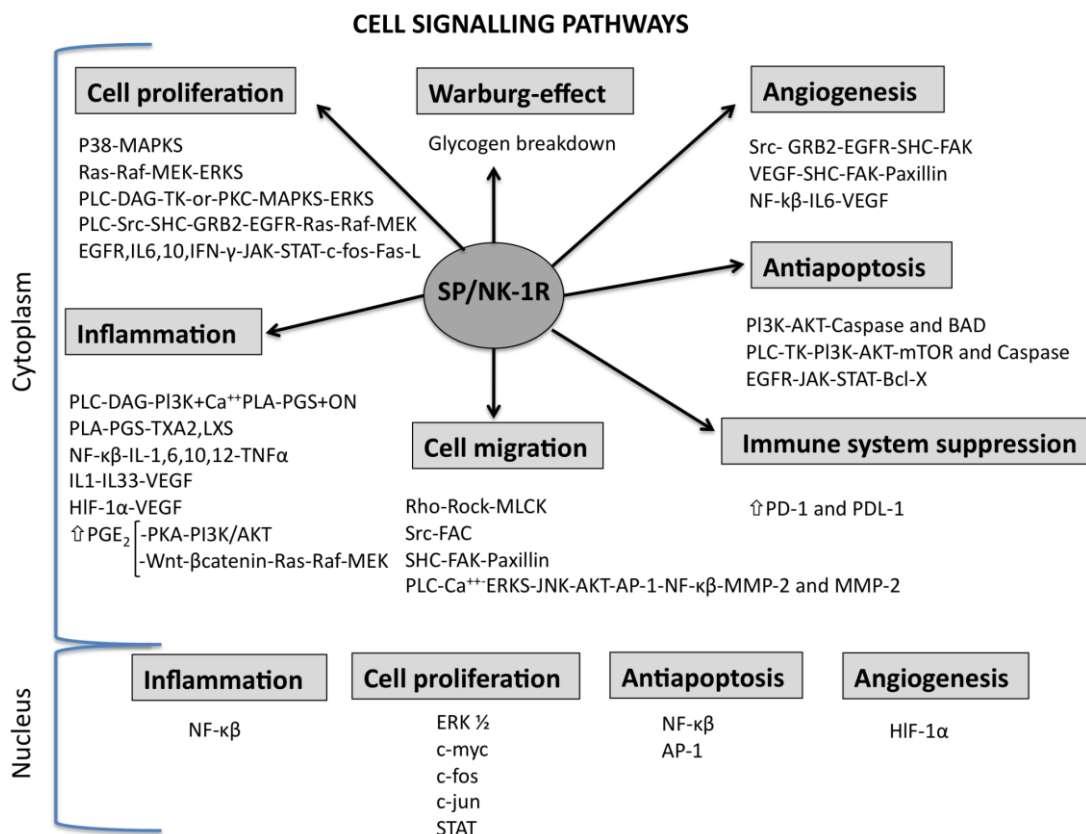
La SP, caracterizada como uno de los principales señalizadores celulares y habiendo sido reconocida como un péptido proncoogénico, podría suponer un mediador involucrado en la constitución del microambiente y del comportamiento invasivo que caracteriza al CFA.

Los fármacos antagonistas del receptor NK-1R podrían suponer un interesante campo de investigación farmacológica para el tratamiento médico del CFA. Ya han demostrado resultar eficaces en modelos *in vitro* e *in vivo* de diferentes tumores. Estos fármacos se usan en la práctica clínica habitual y tienen indicación para el tratamiento de los vómitos asociados a quimioterapia. Existen comercializados el aprepitant y de su profármaco el fosaprepitant, si bien, las dosis en la que estos fármacos se demuestran antieméticos son muy inferiores a las necesarias para alcanzar efectos oncolíticos como el Dr. Muñoz ha demostrado en sus trabajos<sup>(113,115,133)</sup>.

Para profundizar en la utilidad del bloqueo de NK-1R como terapia contra el CFA, los siguientes trabajos deberían ir dirigidos a la administración de antagonistas de NK-1R sobre cultivos celulares de CFA. Se debería de comprobar la respuesta que ejercen estos fármacos para desencadenar la apoptosis celular o evitar la entrada en la fase G1 del ciclo celular. Posteriormente los estudios basados en xenoinjertos podrían demostrar su efecto *in vivo*.

En el caso del CFA las dianas moleculares en desarrollo en fase clínica son diversas: antagonistas de IL-6, inhibidores de la vía MAPK y CPI. Otras potenciales con evidencia preclínica son los inhibidores de la vía SHH, WNT, EGFR o FGFR<sup>(1,7,51,61)</sup>. Es claro que la inhibición de solo una de estas vías sea insuficiente a no ser que existan mecanismos de adicción oncogénicos por filiar. Sin embargo, los antagonistas de NK-1R han demostrado inhibir las vías celulares anteriores entre otras<sup>(155)</sup> (**Figura 29**). Además, ha sido sugerido un papel importante en la progresión tumoral del carcinoma de células escamosas de cabeza dado que SP/NK-1R se sobreexpresa en dichas células. Por lo que una intervención terapéutica con el antagonista de NK-1R aprepitant podría ser una estrategia terapéutica en futuros ensayos clínicos<sup>(156)</sup>.

La existencia de mecanismos celulares de resistencia al tratamiento con antagonistas NK-1R no se han descrito, pero la importante plasticidad y mutabilidad de la célula tumoral es compatible con el desarrollo de dichos mecanismos. A pesar de que se ha demostrado que el NK-1R es esencial para la viabilidad de las células tumorales<sup>(78)</sup>, el NK-1R no es esencial para las células normales no tumorales<sup>(78)</sup>. Este hecho puede justificar por qué la citotoxicidad de los NK-1R antagonistas incluido el fármaco aprepitant, es mayor en las células tumorales que en las normales. Por lo tanto, la selectividad de este tipo de fármacos sería muy elevada, al contrario que la quimioterapia que a dosis terapéuticas incluyen toxicidad en el organismo, incluso derivando en daño grave y mortal. Sería interesante la realización de ensayos clínicos con antagonistas de NK-1R como aprepitant para demostrar actividad antitumoral en CFA en humanos.



**Figura 29:** Efecto de la activación del NK-1R por la SP y su relación con las principales vías de desarrollo oncogénico. *Extraído de Munoz M, Rosso M, Covenas R, Neurokinin-1 Receptor Antagonists in Lung Cancer Therapy, Letters in Drug Design & Discovery 2017; 14(12)*

## 7. Conclusiones

- 1- Se describe en este trabajo por primera vez la existencia de la SP y del NK-1R en el CFA.
- 2- También se describe en este trabajo por primera vez la existencia de la SP y del NK-1R en la hipófisis sana.
- 3- La SP y el NK-1R se sobreexpresan en el CFA con respecto a la hipófisis sana. La existencia y sobreexpresión de la SP y del NK-1R en el CFA nos permite considerar que existen mecanismos reguladores del crecimiento y funcionamiento del CFA que están regidos por la acción de la SP/NK-1R.
- 4- La SP se distribuye en todo el CFA localizándose preferentemente en el citoplasma y núcleo de sus células. Por lo que estaría regulando la señalización citoplásmica y nuclear y por tanto la mitogénesis de las células del CFA. Además, las células de la RG y del endotelio vascular también expresan SP preferentemente en los núcleos celulares sugiriendo su participación en el proceso inflamatorio y angiogénico asociado al CFA.
- 5- El NK-1R se expresa más a nivel de la RG, sobre todo en los núcleos y membranas de las células inflamatorias presentes en su parénquima (linfocitos, macrófagos y células gliales). Por lo que estarían participando en los fenómenos inflamatorios asociados, incluyendo la mitogénesis de dichas células. En los vasos sanguíneos del CFA, el NK-1R se expresa en la membrana y el citoplasma de las células endoteliales y en los fibroblastos que componen sus membranas basales. En otras regiones del tumor como el EE y en las CC, el NK-1R se expresa en la membrana de las células de dichas áreas. Dado que el NK-1R es un receptor de membrana, estaría regulando la señalización celular SP/NK-1R en dichas células.
- 6- Con todo lo descrito anteriormente se puede sugerir que la SP y su receptor NK-1R ejercen funciones señalizadoras en el CFA dentro del modelo SASP que regula su oncogénesis.
- 7- El tratamiento farmacológico con antagonistas NK-1R como aprepitant bloquearía la señalización mediada por SP en el CFA permitiendo ejercer efectos oncolíticos y antiinflamatorios minimizando la gran morbilidad que los tratamientos quirúrgicos y radioterápicos causan en los pacientes afectados. El desarrollo de ensayos clínicos con fármacos antagonistas del NK-1R en el

tratamiento del CFA se erige como una interesante línea de investigación clínica para lograr mejorar la supervivencia, disminuir la morbilidad y mejorar la calidad de vida de los enfermos de CFA.

## 8. Bibliografía

1. Martínez-Barbera JP, Buslei R. Adamantinomatous craniopharyngioma: Pathology, molecular genetics and mouse models. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2015;28(1–2):7–17.
2. Müller HL, Merchant TE, Warmuth-Metz M, Martínez-Barbera JP, Puget S. Craniopharyngioma. *Nat Rev Dis Prim.* 2019;5(1).
3. Barkhoudarian G, Laws ER. Craniopharyngioma: History. *Pituitary.* 2013;16(1):1–8.
4. Müller HL, Merchant TE, Puget S, Martínez-Barbera JP. New outlook on the diagnosis, treatment and follow-up of childhood-onset craniopharyngioma. *Nat Rev Endocrinol.* 2017;13(5):299–312.
5. Muller HL. The Diagnosis and Treatment of Craniopharyngioma. Vol. 110, *Neuroendocrinology.* 2020. 753–766.
6. Whelan R, Hengartner A, Folzenlogen Z, Prince E, Hankinson TC. Adamantinomatous craniopharyngioma in the molecular age and the potential of targeted therapies: a review. *Child's Nerv Syst.* 2020;36(8):1635–42.
7. Karavitaki N, Larkin S. Recent advances in molecular pathology of craniopharyngioma. *F1000Research.* 2017;6(0):1–9.
8. Jensterle M, Jazbinsek S, Bosnjak R, Popovic M, Zaletel LZ, Vesnaver TV, et al. Advances in the management of craniopharyngioma in children and adults. *Radiol Oncol.* 2019;
9. 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.
10. Larkin SJ, Ansorge O. Pathology and pathogenesis of craniopharyngiomas. *Pituitary.* 2013;16(1):9–17.
11. Shultz J. Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER). *Encycl Cancer Soc.* 2014;14(8):1070–8.



12. Makino K, Nakamura H, Yano S, Kuratsu JI. Population-based epidemiological study of primary intracranial tumors in childhood. *Child's Nerv Syst.* 2010;26(8):1029–34.
13. Rosemberg S, Fujiwara D. Epidemiology of pediatric tumors of the nervous system according to the WHO 2000 classification: A report of 1,195 cases from a single institution. *Child's Nerv Syst.* 2005;21(11):940–4.
14. Davis DH, Barnes LE, Stephan BC, MacLulich AM, Meagher D, Copeland J, et al. The descriptive epidemiology of. *BMC Geriatr.* 2014;3(6):547–51.
15. Boch AL, van Effenterre R, Kujas M. Craniopharyngiomas in two consanguineous siblings: case report. *Neurosurgery.* 1997 Nov;41(5):1185–7.
16. Green AL, Yeh JS, Dias PS. Craniopharyngioma in a mother and daughter. *Acta Neurochir (Wien).* 2002;144(4):403–4.
17. Hoffmann A, Boekhoff S, Gebhardt U, Sterkenburg AS, Daubenbüchel AMM, Eveslage M, et al. History before diagnosis in childhood craniopharyngioma: Associations with initial presentation and long-term prognosis. *Eur J Endocrinol.* 2015;173(6):853–62.
18. Karavitaki N, Cudlip S, Adams CBT, Wass JAH. Craniopharyngiomas. *Endocr Rev.* 2006;27(4):371–97.
19. Bogusz A, Müller HL. Childhood-onset craniopharyngioma: latest insights into pathology, diagnostics, treatment, and follow-up. *Expert Rev Neurother.* 2018;18(10):793–806.
20. Daubenbüchel AMM, Hoffmann A, Gebhardt U, Warmuth-Metz M, Sterkenburg AS, Müller HL. Hydrocephalus and hypothalamic involvement in pediatric patients with craniopharyngioma or cysts of Rathke's pouch: Impact on long-term prognosis. *Eur J Endocrinol.* 2015;172(5):561–9.
21. Famini P, Maya MM, Melmed S. Pituitary magnetic resonance imaging for sellar and parasellar masses: Ten-year experience in 2598 patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(6):1633–41.
22. Rossi A, Cama A, Consales A, Gandolfo C, Garrè ML, Milanaccio C, et al. Neuroimaging of pediatric craniopharyngiomas: a pictorial essay. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2006 Apr;19 Suppl 1:299–319.

23. Tsuruda J, Bradley G, Society R. MR of Craniopharyngiomas : 2000;
24. Frangou EM, Tynan JR, Robinson CA, Ogieglo LM, Vitali AM. Metastatic craniopharyngioma: Case report and literature review. *Child's Nerv Syst.* 2009;25(9):1143–7.
25. Warmuth-Metz M, Gnekow AK, Müller H, Solymosi L. Differential diagnosis of suprasellar tumors in children. *Klin Padiatr.* 2004;216(6):323–30.
26. Müller HL, Gebhardt U, Faldum A, Warmuth-Metz M, Pietsch T, Pohl F, et al. Xanthogranuloma, Rathke's cyst, and childhood craniopharyngioma: Results of prospective multinational studies of children and adolescents with rare sellar malformations. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(11):3935–43.
27. Müller HL, Gebhardt U, Etavard-Gorris N, Kolb R, Warmuth-Metz M, Sorensen N. Current strategies in diagnostics and endocrine treatment of patients with childhood craniopharyngioma during follow-up - Recommendations in KRANIOPHARYNGEOM 2000. *Onkologie.* 2005;28(3):150–6.
28. Boekhoff S, Bison B, Eveslage M, Sowithayasakul P, Müller HL. Craniopharyngiomas presenting as incidentalomas: results of KRANIOPHARYNGEOM 2007. *Pituitary.* 2019;22(5):532–41.
29. Bogusz A, Boekhoff S, Warmuth-Metz M, Calaminus G, Eveslage M, Müller HL. Posterior hypothalamus-sparing surgery improves outcome after childhood craniopharyngioma. *Endocr Connect.* 2019;8(5):481–92.
30. Hidalgo ET, Orillac C, Kvint S, McQuinn MW, Dastagirzada Y, Phillips S, et al. Quality of life, hypothalamic obesity, and sexual function in adulthood two decades after primary gross-total resection for childhood craniopharyngioma. *Child's Nerv Syst.* 2020;36(2):281–9.
31. Ordóñez-Rubiano EG, Forbes JA, Morgenstern PF, Arko L, Dobri GA, Greenfield JP, et al. Preserve or sacrifice the stalk? Endocrinological outcomes, extent of resection, and recurrence rates following endoscopic endonasal resection of craniopharyngiomas. *J Neurosurg.* 2019 Oct;131(4):1163–71.
32. Prieto R, Pascual JM, Rosdolsky M, Barrios L. Preoperative Assessment of Craniopharyngioma Adherence: Magnetic Resonance Imaging Findings Correlated with

the Severity of Tumor Attachment to the Hypothalamus. *World Neurosurg.* 2018;110:e404–26.

33. Puget S, Garnett M, Wray A, Grill J, Habrand JL, Bodaert N, et al. Pediatric craniopharyngiomas: Classification and treatment according to the degree of hypothalamic involvement. *J Neurosurg.* 2007;106:3–12.

34. Mallucci C, Pizer B, Blair J, Didi M, Doss A, Upadrasta S, et al. Management of craniopharyngioma: the liverpool experience following the introduction of the CCLG guidelines. introducing a new risk assessment grading system. *Child's Nerv Syst.* 2012;28(8):1181–92.

35. Koutourousiou M, Fernandez-Miranda JC, Wang EW, Snyderman CH, Gardner PA. The limits of transsellar/transtuberculum surgery for craniopharyngioma. *J Neurosurg Sci.* 2018;62(3):301–9.

36. Elliott RE, Jane JA, Wisoff JH. Surgical management of craniopharyngiomas in children: Meta-analysis and comparison of transcranial and transsphenoidal approaches. *Neurosurgery.* 2011;69(3):630–43.

37. Liu JK, Sevak IA, Carmel PW, Eloy JA. Microscopic versus endoscopic approaches for craniopharyngiomas: Choosing the optimal surgical corridor for maximizing extent of resection and complication avoidance using a personalized, tailored approach. *Neurosurg Focus.* 2016;41(6):1–18.

38. Hardesty DA, Montaser AS, Beer-Furlan A, Carrau RL, Prevedello DM. Limits of endoscopic endonasal surgery for III ventricle craniopharyngiomas. *J Neurosurg Sci.* 2018;62(3):310–21.

39. Hill TK, Baine MJ, Verma V, Alam M, Lyden ER, Lin C, et al. Patterns of care in pediatric craniopharyngioma: Outcomes following definitive radiotherapy. *Anticancer Res.* 2019;39(2):803–7.

40. Yang I, Sughrue ME, Rutkowski MJ, Kaur R, Ivan ME, Aranda D, et al. Craniopharyngioma: A comparison of tumor control with various treatment strategies. *Neurosurg Focus.* 2010;28(4):1–11.

41. Fahlbusch R, Honegger J, Paulus W, Huk W, Buchfelder M. Surgical treatment of craniopharyngiomas: Experience with 168 patients. *J Neurosurg.* 1999;90(2):237–50.

42. Kilday JP, Caldarelli M, Massimi L, Chen RHH, Lee YY, Liang ML, et al. Intracystic interferon-alpha in pediatric craniopharyngioma patients: An international multicenter assessment on behalf of SIOPE and ISPN. *Neuro Oncol.* 2017;19(10):1398–407.
43. Zhang S, Fang Y, Cai BW, Xu JG, You C. Intracystic bleomycin for cystic craniopharyngiomas in children. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016;2016(7).
44. Elowe-Gruau E, Beltrand J, Brauner R, Pinto G, Samara-Boustani D, Thalassinos C, et al. Childhood craniopharyngioma: Hypothalamus-sparing surgery decreases the risk of obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(6):2376–82.
45. Adeberg S, Harrabi SB, Bougatf N, Verma V, Windisch P, Bernhardt D, et al. Dosimetric comparison of proton radiation therapy, volumetric modulated arc therapy, and three-dimensional conformal radiotherapy based on intracranial tumor location. *Cancers (Basel).* 2018;10(11).
46. Zhu W, Li X, He J, Sun T, Li C, Gong J. A reformed surgical treatment modality for children with giant cystic craniopharyngioma. *Child's Nerv Syst.* 2017;33(9):1491–500.
47. Fournier-Goodnight AS, Ashford JM, Merchant TE, Boop FA, Indelicato DJ, Wang L, et al. Neurocognitive functioning in pediatric craniopharyngioma: performance before treatment with proton therapy. *J Neurooncol.* 2017;134(1):97–105.
48. Poretti A, Grotzer MA, Ribic K, Schönle E, Boltshauser E. Outcome of craniopharyngioma in children: Long-term complications and quality of life. *Dev Med Child Neurol.* 2004;46(4):220–9.
49. Ondruch A, Maryniak A, Kropiwnicki T, Roszkowski M, Daszkiewicz P. Cognitive and social functioning in children and adolescents after the removal of craniopharyngioma. *Child's Nerv Syst.* 2011;27(3):391–7.
50. Özyurt J, Thiel CM, Lorenzen A, Gebhardt U, Calaminus G, Warmuth-Metz M, et al. Neuropsychological outcome in patients with childhood craniopharyngioma and hypothalamic involvement. *J Pediatr.* 2014;164(4): 876-881.
51. Carreno G, Boulton JKR, Apps J, Gonzalez-Meljem JM, Haston S, Guiho R, et al. SHH pathway inhibition is protumorigenic in adamantinomatous craniopharyngioma. *Endocr Relat Cancer.* 2019;26(3):355–66.

52. Grob S, Mirsky DM, Donson AM, Dahl N, Foreman NK, Hoffman LM, et al. Targeting IL-6 is a potential treatment for primary cystic craniopharyngioma. *Front Oncol.* 2019;9:1–6.
53. Brastianos PK, Shankar GM, Gill CM, Taylor-Weiner A, Nayyar N, Panka DJ, et al. Dramatic Response of BRAF V600E Mutant Papillary Craniopharyngioma to Targeted Therapy. *J Natl Cancer Inst.* 2016;108(2):1–5.
54. Shah K, Panchal S, Patel B. Porcupine inhibitors: Novel and emerging anti-cancer therapeutics targeting the Wnt signaling pathway. *Pharmacol Res.* 2021;167:105532.
55. Buslei R, Nolde M, Hofmann B, Meissner S, Eyupoglu IY, Siebzehnriibl F, et al. Common mutations of  $\beta$ -catenin in adamantinomatous craniopharyngiomas but not in other tumours originating from the sellar region. *Acta Neuropathol.* 2005;109(6):589–97.
56. Hölsken A, Buchfelder M, Fahlbusch R, Blümcke I, Buslei R. Tumour cell migration in adamantinomatous craniopharyngiomas is promoted by activated Wnt-signalling. *Acta Neuropathol.* 2010;119(5):631–9.
57. Zhang Y, Wang X. Targeting the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in cancer. *J Hematol Oncol.* 2020;13(1):1–16.
58. Lathia JD, Heddleston JM, Venere M, Rich JN. Deadly teamwork: Neural cancer stem cells and the tumor microenvironment. *Cell Stem Cell.* 2011;8(5):482–5.
59. Gonzalez-Meljem JM, Martinez-Barbera JP. Senescence drives non-cell autonomous tumorigenesis in the pituitary gland. *Mol Cell Oncol.* 2018;5(3):1–3.
60. Bu L, Baba H, Yoshida N, Miyake K, Yasuda T, Uchihara T, et al. Biological heterogeneity and versatility of cancer-associated fibroblasts in the tumor microenvironment. *Oncogene.* 2019;38(25):4887–901.
61. Andoniadou CL, Gaston-Massuet C, Reddy R, Schneider RP, Blasco MA, Le Tissier P, et al. Identification of novel pathways involved in the pathogenesis of human adamantinomatous craniopharyngioma. *Acta Neuropathol.* 2012;124(2):259–71.
62. Martinez-Barbera JP, Andoniadou CL. Concise Review: Paracrine Role of Stem Cells in Pituitary Tumors: A Focus on Adamantinomatous Craniopharyngioma. *Stem Cells.* 2016;34(2):268–76.

63. Gupta S, Bi WL, Larsen AG, Al-Abdulmohsen S, Abedalthagafi M, Dunn IF. Craniopharyngioma: A roadmap for scientific translation. *Neurosurg Focus*. 2018;44(6):1–8.
64. Pan Y, Yu Y, Wang X, Zhang T. Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity. *Front Immunol*. 2020;11:583084.
65. Apps JR, Carreno G, Gonzalez-Meljem JM, Haston S, Guiho R, Cooper JE, et al. Tumour compartment transcriptomics demonstrates the activation of inflammatory and odontogenic programmes in human adamantinomatous craniopharyngioma and identifies the MAPK/ERK pathway as a novel therapeutic target. *Acta Neuropathol*. 2018;135(5):757–77.
66. Donson AM, Apps J, Griesinger AM, Amani V, Witt DA, Anderson R, et al. Molecular analyses reveal inflammatory mediators in the solid component and cyst fluid of human adamantinomatous craniopharyngioma. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2017;76(9):779–88.
67. Kirkland JL, Tchkonja T. Cellular Senescence: A Translational Perspective. *EBioMedicine*. 2017;21:21–8.
68. Mario Gonzalez-Meljem J, Haston S, Carreno G, Apps JR, Pozzi S, Stache C, et al. Stem cell senescence drives age-attenuated induction of pituitary tumours in mouse models of paediatric craniopharyngioma. *Nat Commun*. 2017;8(1):1–14.
69. Andoniadou CL, Matsushima D, Mousavy Gharavy SN, Signore M, Mackintosh AI, Schaeffer M, et al. Sox2+ stem/progenitor cells in the adult mouse pituitary support organ homeostasis and have tumor-inducing potential. *Cell Stem Cell*. 2013;13(4):433–45.
70. Nicolas M, Wolfer A, Raj K, Kummer JA, Mill P, Van Noort M, et al. Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. *Nat Genet*. 2003;33(3):416–21.
71. Arwert EN, Lal R, Quist S, Rosewell I, Van Rooijen N, Watt FM. Tumor formation initiated by nondividing epidermal cells via an inflammatory infiltrate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(46):19903–8.
72. Kode A, Manavalan JS, Mosialou I, Bhagat G, Rathinam C V., Luo N, et al. Leukaemogenesis induced by an activating  $\beta$ -catenin mutation in osteoblasts. *Nature*. 2014;506(7487):240–4.

73. Lujambio A, Akkari L, Simon J, Grace D, Tschaharganeh DF, Bolden JE, et al. Non-cell-autonomous tumor suppression by p53. *Cell*. 2013;153(2):449–60.
74. Burghaus S, Hölsken A, Buchfelder M, Fahlbusch R, Riederer BM, Hans V, et al. A tumor-specific cellular environment at the brain invasion border of adamantinomatous craniopharyngiomas. *Virchows Arch*. 2010;456(3):287–300.
75. Muñoz M, Coveñas R. Involvement of substance P and the NK-1 receptor in cancer progression. *Peptides*. 2013; 48:1–9.
76. Muñoz M, Coveñas R. Involvement of substance P and the NK-1 receptor in human pathology. *Amino Acids*. 2014;46(7):1727–50.
77. Coveñas R, Muñoz M. Cancer progression and substance P. *Histol Histopathol*. 2014;29(7):881–90.
78. Muñoz MF, Argüelles S, Rosso M, Medina R, Coveñas R, Ayala A, et al. The Neurokinin-1 Receptor Is Essential for the Viability of Human Glioma Cells : A Possible Target for Treating Glioblastoma. 2022:6291504.
79. Esteban F, Muñoz M, González-Moles MA, Rosso M. A role for substance P in cancer promotion and progression: A mechanism to counteract intracellular death signals following oncogene activation or DNA damage. *Cancer Metastasis Rev*. 2006;25(1):137–45.
80. Chang MM, Leeman SE, Niall HD. Amino-acid Sequence of Substance P. *Nat New Biol*. 1971 Jul;232(29):86–7.
81. Beaujouan JC, Torrens Y, Saffroy M, Kemel ML, Glowinski J. A 25 year adventure in the field of tachykinins. *Peptides*. 2004;25(3):339–57.
82. Pennefather JN, Lecci A, Candenas ML, Patak E, Pinto FM, Maggi CA. Tachykinins and tachykinin receptors: A growing family. *Life Sci*. 2004;74(12):1445–63.
83. Garcia-Recio S, Gascón P. Biological and Pharmacological Aspects of the NK1-Receptor. *Biomed Res Int*. 2015.
84. von Euler U, Gaddum J. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J Physiol*. 1948;72(1):74–87.



85. Iftikhar K, Siddiq A, Baig SG, Zehra S. Substance P: A neuropeptide involved in the psychopathology of anxiety disorders. *Neuropeptides*. 2020; 79:101993.
86. Zieglgänsberger W. Substance P and pain chronicity. *Cell Tissue Res*. 2019;375(1):227–41.
87. Armstrong DM, Pickel VM, Joh TH, Reis DJ, Miller RJ. Immunocytochemical localization of catecholamine synthesizing enzymes and neuropeptides in area postrema and medial nucleus tractus solitarius of rat brain. *J Comp Neurol*. 1981;196(3):505–17.
88. Suvas S. Role of Substance P Neuropeptide in Inflammation, Wound Healing, and Tissue Homeostasis. *J Immunol*. 2017;199(5):1543–52.
89. Nowicki M, Ostalska-Nowicka D, Kondraciuk B, Miskowiak B. The significance of substance P in physiological and malignant haematopoiesis. *J Clin Pathol*. 2007;60(7):749–55.
90. Payan DG. Receptor-mediated mitogenic effects of substance P on cultured smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1985;130(1):104–9.
91. Burbach JPH. What are neuropeptides? Vol. 789, *Methods in Molecular Biology*. 2011. 1–36.
92. Carthew HL, Ziebell JM, Vink R. Substance P-induced changes in cell genesis following diffuse traumatic brain injury. *Neuroscience*. 2012;214:78–83.
93. Mashaghi A, Marmalidou A, Tehrani M, Grace PM, Pothoulakis C, Dana R. Neuropeptide substance P and the immune response. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(22):4249–64.
94. O'Connor TM, O'Connell J, O'Brien DI, Goode T, Bredin CP, Shanahan F. The role of substance P in inflammatory disease. *J Cell Physiol*. 2004;201(2):167–80.
95. Ebner K, Singewald N. The role of substance P in stress and anxiety responses. *Amino Acids*. 2006;31(3):251–72.
96. Molinos-Quintana A, Trujillo-Hacha P, Piruat JI, Bejarano-García JA, García-Guerrero E, Pérez-Simón JA, et al. Human acute myeloid leukemia cells express Neurokinin-1 receptor, which is involved in the antileukemic effect of Neurokinin-1 receptor antagonists. *Invest New Drugs*. 2019;37(1):17–26.

97. Herpfer I, Lieb K. Substance P Receptor Antagonists in Psychiatry. *CNS Drugs*. 2005;19(4):275–93.
98. Muñoz M, Parrilla J, Rosso M, Coveñas R. Antipruritic vs. Antitumour action of aprepitant: A question of dose. *Acta Derm Venereol*. 2019;99(6):620–1.
99. Hesketh PJ, Grunberg SM, Gralla RJ, Warr DG, Roila F, De Wit R, et al. The oral neurokinin-1 antagonist aprepitant for the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting: A multinational, randomized, double-blind, placebo-controlled trial in patients receiving high-dose cisplatin - The Aprepitant Protocol 052 Study G. *J Clin Oncol*. 2003;21(22):4112–9.
100. Javid H, Mohammadi F, Zahiri E, Hashemy SI. The emerging role of substance P/neurokinin-1 receptor signaling pathways in growth and development of tumor cells. *J Physiol Biochem*. 2019;75(4):415–21.
101. Muñoz M, Rosso M, Carranza A, Coveñas R. Increased nuclear localization of substance P in human gastric tumor cells. *Acta Histochem*. 2017;119(3):337–42.
102. Isorna I, Esteban F, Solanellas J, Coveñas R, Muñoz M. The substance P and neurokinin-1 receptor system in human thyroid cancer: An immunohistochemical study. *Eur J Histochem*. 2020;64(2):139–47.
103. Luo J, Solimini NL, Elledge SJ. Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction. *Cell*. 2009;136(5):823–37.
104. Li T, Copeland C, Le A. Glutamine Metabolism in Cancer. In: *Adv Exp Med Biol*. 2021. 17–38.
105. Wang F, Liu S, Liu J, Feng F, Guo Y, Zhang W, et al. SP promotes cell proliferation in esophageal squamous cell carcinoma through the NK1R/Hes1 axis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019;514(4):1210–6.
106. Yamaguchi K, Kugimiya T, Miyazaki T. Substance P receptor in U373 MG human astrocytoma cells activates mitogen-activated protein kinases ERK1/2 through Src. *Brain Tumor Pathol*. 2005;22(1):1–8.
107. Javid H, Asadi J, Zahedi Avval F, Afshari AR, Hashemy SI. The role of substance P/neurokinin 1 receptor in the pathogenesis of esophageal squamous cell carcinoma through constitutively active PI3K/Akt/NF-κB signal transduction pathways. *Mol Biol Rep*. 2020;47(3):2253–63.

108. Mayordomo C, García-Recio S, Ametller E, Fernández-Nogueira P, Pastor-Arroyo EM, Vinyals L, et al. Targeting of substance P induces cancer cell death and decreases the steady state of EGFR and Her2. *J Cell Physiol.* 2012;227(4):1358–66.
109. Luo W, Sharif TR, Sharif M. Substance P-induced mitogenesis in human astrocytoma cells correlates with activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Cancer Res.* 1996 Nov 1;56(21):4983–91.
110. Zhang N, Wei P, Gong A, Chiu WT, Lee H Te, Colman H, et al. FoxM1 Promotes  $\beta$ -Catenin Nuclear Localization and Controls Wnt Target-Gene Expression and Glioma Tumorigenesis. *Cancer Cell.* 2011;20(4):427–42.
111. Garnier A, Vykoukal J, Hubertus J, Alt E, Von Schweinitz D, Kappler R, et al. Targeting the neurokinin-1 receptor inhibits growth of human colon cancer cells. *Int J Oncol.* 2015;47(1):151–60.
112. Ilmer M, Garnier A, Vykoukal J, Alt E, Von Schweinitz D, Kappler R, et al. Targeting the neurokinin-1 receptor compromises canonical Wnt signaling in hepatoblastoma. *Mol Cancer Ther.* 2015;14(12):2712–21.
113. Muñoz M, Coveñas R, Esteban F, Redondo M. The substance P/NK-1 receptor system: NK-1 receptor antagonists as anti-cancer drugs. *J Biosci.* 2015;40(2):441–63.
114. Pascale RM, Calvisi DF, Simile MM, Feo CF, Feo F. The warburg effect 97 years after its discovery. *Cancers (Basel).* 2020;12(10):1–33.
115. Munoz M, Rosso M, Covenas R. A New Frontier in the Treatment of Cancer: NK-1 Receptor Antagonists. *Curr Med Chem.* 2010;17(6):504–16.
116. Ziche M, Morbidelli L, Pacini M, Geppetti P, Alessandri G, Maggi CA. Substance P stimulates neovascularization in vivo and proliferation of cultured endothelial cells. *Microvasc Res.* 1990 Sep;40(2):264–78.
117. Rosso M, Muñoz M, Berger M. The role of neurokinin-1 receptor in the microenvironment of inflammation and cancer. *Sci World J.* 2012;2012.
118. Muñoz M, Coveñas R. Glioma and Neurokinin-1 Receptor Antagonists: A New Therapeutic Approach. *Anticancer Agents Med Chem.* 2018;19(1):92–100.
119. Muñoz M, Rosso M. The NK-1 receptor antagonist aprepitant as a broad spectrum antitumor drug. *Invest New Drugs.* 2010;28(2):187–93.

120. García-Aranda M, Téllez T, McKenna L, Redondo M. Neurokinin-1 Receptor (NK-1R) Antagonists as a New Strategy to Overcome Cancer Resistance. *Cancers (Basel)*. 2022;14(9):2255.
121. Li J, Zeng Q, Zhang Y, Li X, Hu H, Miao X, et al. Neurokinin-1 receptor mediated breast cancer cell migration by increased expression of MMP-2 and MMP-14. *Eur J Cell Biol*. 2016;95(10):368–77.
122. Meshki J, Douglas SD, Hu M, Leeman SE, Tuluc F. Substance P induces rapid and transient membrane blebbing in U373MG cells in a p21-activated kinase-dependent manner. *PLoS One*. 2011;6(9).
123. Meshki J, Douglas SD, Lai JP, Schwartz L, Kilpatrick LE, Tuluc F. Neurokinin 1 receptor mediates membrane blebbing in HEK293 cells through a Rho/Rho-associated coiled-coil kinase-dependent mechanism. *J Biol Chem*. 2009;284(14):9280–9.
124. Rodriguez PL, Jiang S, Fu Y, Avraham S, Avraham HK. The proinflammatory peptide substance P promotes blood-brain barrier breaching by breast cancer cells through changes in microvascular endothelial cell tight junctions. *Int J cancer*. 2014;134(5):1034–44.
125. Lieb K, Fiebich BL, Berger M, Bauer J, Schulze-Osthoff K. The neuropeptide substance P activates transcription factor NF-kappa B and kappa B-dependent gene expression in human astrocytoma cells. *J Immunol*. 1997;159(10):4952–8.
126. Yamaguchi K, Kumakura S, Murakami T, Someya A, Inada E, Nagaoka I. Ketamine suppresses the substance P-induced production of IL-6 and IL-8 by human U373MG glioblastoma/astrocytoma cells. *Int J Mol Med*. 2017;39(3):687–92.
127. Mehboob R, Gilani SA, Hassan A, Sadaf, Tanvir I, Javaid S, Khalid S, Hasan S, Waseem H, Alwazzan A, Munoz M. Prognostic Significance of Substance P/Neurokinin 1 Receptor and Its Association with Hormonal Receptors in Breast Carcinoma. *Biomed Res Int*. 2021:5577820
128. Hennig IM, Laissue JA, Horisberger U, Reubi JC. Substance-P receptors in human primary neoplasms: tumoral and vascular localization. *Int J cancer*. 1995;61(6):786–92.
129. Bayati S, Bashash D, Ahmadian S, Safaroghli-Azar A, Alimoghaddam K, Ghavamzadeh A, et al. Inhibition of tachykinin NK1 receptor using aprepitant induces

apoptotic cell death and G1 arrest through Akt/p53 axis in pre-B acute lymphoblastic leukemia cells. *Eur J Pharmacol.* 2016;791:274–83.

130. Zhou Y, Zhao L, Xiong T, Chen X, Zhang Y, Yu M, et al. Roles of full-length and truncated neurokinin-1 receptors on tumor progression and distant metastasis in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;140(1):49–61.

131. Berger M, Neth O, Ilmer M, Garnier A, Salinas-Martín MV, de Agustín Asencio JC, et al. Hepatoblastoma cells express truncated neurokinin-1 receptor and can be growth inhibited by aprepitant in vitro and in vivo. *J Hepatol.* 2014;60(5):985–94.

132. Zhang Y-X, Li X-F, Yuan G-Q, Hu H, Song X-Y, Li J-Y, et al.  $\beta$ -Arrestin 1 has an essential role in neurokinin-1 receptor-mediated glioblastoma cell proliferation and G2/M phase transition. *J Biol Chem.* 2017;292(21):8933–47.

133. Muñoz M, Coveñas R. The neurokinin-1 receptor antagonist aprepitant: An intelligent bullet against cancer? *Cancers (Basel).* 2020;12(9):1–22.

134. Hussain I, Eloy JA, Carmel PW, Liu JK. Molecular oncogenesis of craniopharyngioma: Current and future strategies for the development of targeted therapies: A review. *J Neurosurg.* 2013;119(1):106–12.

135. Gala MK, Chan AT. Molecular Pathways: Aspirin and Wnt Signaling—A Molecularly Targeted Approach to Cancer Prevention and Treatment. *Clin Cancer Res.* 2015;21(7):1543–8.

136. Muñoz M, Crespo J, Crespo J, Coveñas R. Neurokinin-1 receptor antagonist aprepitant and radiotherapy, a successful combination therapy in a patient with lung cancer: A case report. *Mol Clin Oncol.* 2019;11(1):50-54.

137. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 2022 Jan 1;12(1):31–46.

138. Xiao Y, Yu D. Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer. *Pharmacol Ther.* 2021;221:107753.

139. Gaston-Massuet C, Andoniadou CL, Signore M, Jayakody SA, Charolidi N, Kyeyune R, et al. Increased Wingless (Wnt) signaling in pituitary progenitor/stem cells gives rise to pituitary tumors in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(28):11482–7.

140. Rosso M, Robles-Frías MJ, Coveñas R, Salinas-Martín MV, Muñoz M. The NK-1 receptor is expressed in human primary gastric and colon adenocarcinomas and is involved in the antitumor action of L-733,060 and the mitogenic action of substance P on human gastrointestinal cancer cell lines. *Tumour Biol.* 2008;29(4):245-54.
141. Lim JE, Chung E, Son Y. A neuropeptide, Substance-P, directly induces tissue-repairing M2 like macrophages by activating the PI3K/Akt/mTOR pathway even in the presence of IFN $\gamma$ . *Sci Rep.* 2017;7(1):9417.
142. Robinson P, Rodriguez E, Muñoz M. Substance P — Friend or Foe. 2022;10–3.
143. Guo C-J, Lai J-P, Luo H-M, Douglas SD, Ho W-Z. Substance P up-regulates macrophage inflammatory protein-1 $\beta$  expression in human T lymphocytes. *J Neuroimmunol.* 2002;131(1–2):160–7.
144. Whelan R, Prince E, Gilani A, Hankinson T. The Inflammatory Milieu of Adamantinomatous Craniopharyngioma and Its Implications for Treatment. *J Clin Med.* 2020;9(2):519.
145. Tebas P, Tuluc F, Barrett JS, Wagner W, Kim D, Zhao H, et al. A Randomized, Placebo Controlled, Double Masked Phase IB Study Evaluating the Safety and Antiviral Activity of Aprepitant, a Neurokinin-1 Receptor Antagonist in HIV-1 Infected Adults. *PLoS One.* 2011;6(9):24180.
146. Robinson P, Rosso M, Muñoz M. Neurokinin-1 Receptor Antagonists as a Potential Novel Therapeutic Option for Osteosarcoma Patients. *J Clin Med.* 2023;12(6):2135.
147. Apte RS, Chen DS, Ferrara N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell.* 2019;176(6):1248–64.
148. Fukumura D, Kloepper J, Amoozgar Z, Duda DG, Jain RK. Enhancing cancer immunotherapy using antiangiogenics: opportunities and challenges. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018;15(5):325–40.
149. Hegde PS, Wallin JJ, Mancao C. Predictive markers of anti-VEGF and emerging role of angiogenesis inhibitors as immunotherapeutics. *Semin Cancer Biol.* 2018;52:117–24.
150. Zhang Y, Brekken RA. Direct and indirect regulation of the tumor immune microenvironment by VEGF. *J Leukoc Biol.* 2022;111(6):1269–86.

151. Momen Razmgah M, Ghahremanloo A, Javid H, AlAlikhan A, Afshari A-R, Hashemy SI. The effect of substance P and its specific antagonist (aprepitant) on the expression of MMP-2, MMP-9, VEGF, and VEGFR in ovarian cancer cells. *Mol Biol Rep.* 2022;49(10):9307–14.
152. Zhang H, Zhao W, Li X, He Y. Cholesterol Metabolism as a Potential Therapeutic Target and a Prognostic Biomarker for Cancer Immunotherapy. *Onco Targets Ther.* 2021; 14:3803–12.
153. Xiang Y, Miao H. Lipid Metabolism in Tumor-Associated Macrophages. *Adv Exp Med Biol.* 2021;1316:87-101.
154. Lorestani S, Ghahremanloo A, Jangjoo A, Abedi M, Hashemy SI. Evaluation of serum level of substance P and tissue distribution of NK-1 receptor in colorectal cancer. *Mol Biol Rep.* 2020;47(5):3469–74.
155. Munoz M, Rosso M, Covenas R. Neurokinin-1 Receptor Antagonists in Lung Cancer Therapy. *Lett Drug Des Discov.* 2017;14(12).
156. Esteban F, Ramos-García P, Muñoz M, González-Moles MÁ. Substance P and Neurokinin 1 Receptor in Chronic Inflammation and Cancer of the Head and Neck: A Review of the Literature. *Int J Environ Res Public Health.* 2021;19:375.



