



Universidad de Oviedo

Programa de Doctorado “Investigación en Cáncer”

**“Perfiles de Expresión de MicroRNAs y de
Alteraciones Genéticas en Tumores de Origen Glial”**

**Irene Centeno Ramos
Junio 2013**



Universidad de Oviedo

Programa de Doctorado “Investigación en Cáncer”

**“Perfiles de expresión de microRNAs y de
alteraciones genéticas en tumores de origen glial”**

Irene Centeno Ramos
Autora

Milagros Balbín Felechosa
Directora

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Clasificación histopatológica de los gliomas y criterios para el diagnóstico	1
1.2. Alteraciones moleculares en gliomas	5
1.3. Clasificaciones de los gliomas basados en estudios de expresión génica	12
1.4. Implicación de los microRNAs en el desarrollo y mantenimiento tumoral.....	17
2. OBJETIVOS.....	22
3. MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1. Pacientes y muestras	23
3.2. Extracción de ácidos nucleicos	24
3.3. Amplificación mediante PCR y análisis de secuencia	25
3.4. Análisis de metilación del promotor de <i>MGMT</i>	26
3.5. Análisis de alteraciones génicas mediante MLPA	26
3.6. Análisis estadístico	28
3.7. Análisis de expresión de microRNAs en tejido.....	28
3.8. Análisis de los datos de RQ-PCR de microRNAs en tejido	29
4. RESULTADOS.....	30
4.1. Características clínico-patológicas de los pacientes y las muestras tumorales	30
4.2. Análisis de alteraciones moleculares: distribución de frecuencias y correlación con subtipos histológicos y grado tumoral.....	30
4.3. Análisis de supervivencia en relación con las variables clínicas y moleculares.....	36
4.3.1. Análisis de supervivencia: tumores de grado IV.....	37
4.3.2. Análisis de supervivencia: tumores de grado III	42
4.4. Análisis de expresión de microRNAs en gliomas.....	45
4.4.1. Análisis estadístico de la expresión diferencial de microRNAs entre tumores gliales y tejido cerebral normal.....	47

4.5. Clasificación de los gliomas en función de los datos de expresión de microRNAs	49
4.5.1. Caracterización biológica de los nuevos grupos de gliomas definidos por expresión diferencial de microRNAs	50
4.5.2. Definición de un algoritmo para la determinación de los nuevos grupos de gliomas	56
4.5.3. Análisis de las variables clínico-patológicas y moleculares en los grupos determinados por expresión de microRNAs	58
4.5.4. Análisis de supervivencia en los grupos determinados por expresión de microRNAs	58
5. DISCUSIÓN	63
5.1. Alteraciones moleculares	64
5.2. Patrones de expresión de microRNAs	73
6. CONCLUSIONES	85
7. BIBLIOGRAFÍA	87
ANEXOS	i
Anexo 1. Tablas	i
Anexo 2. Figuras	vi

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Clasificación histopatológica de los gliomas y criterios para el diagnóstico

Los gliomas son un grupo heterogéneo de tumores del sistema nervioso central que constituyen las neoplasias intracraneales más frecuentes; suponen alrededor del 3% de todos los tumores y un 30% de los tumores cerebrales. La incidencia media anual de los gliomas malignos está situada entre 6 y 8 casos por cada 100.000 habitantes en Estados Unidos (*Central Brain Tumour Register of the United States*, www.cbtrus.org). En el registro de tumores del SESPA (Servicio de Salud del Principado de Asturias) en el año 2010 se contabilizaron 172 tumores del sistema nervioso central, teniendo 80 de ellos un diagnóstico de glioma, por lo que en nuestra población se registran unos 8 casos por 100.000 habitantes. A pesar de los avances en el conocimiento básico de la biología tumoral y en el desarrollo de terapias en otras neoplasias, el mal pronóstico que caracteriza este tipo tumoral, especialmente en gliomas de alto grado, no ha mejorado en los últimos 40 años, situándose su tasa de supervivencia acumulada a los 5 años por debajo del 5 % (Dolecek y col., 2012).

La naturaleza del SNC es heterogénea, así como la de cualquier tipo tumoral, lo que dificulta la clasificación y estudio de los gliomas. Durante el desarrollo, los distintos tipos de células neurales se generan a partir de un progenitor multipotente común. Durante la gliomagénesis, los tipos tumorales correspondientes podrían generarse también a partir de estos progenitores (figura 1). Estas células madre neurales tienen la capacidad de autorenovarse ilimitadamente y de dar lugar a todos los tipos celulares neurales, a partir de neuronas o células gliales.

Hasta ahora, los gliomas han sido clasificados por su apariencia morfológica, con ayuda de algunos marcadores determinados por inmunohistoquímica. Así, la clasificación actual de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Louis y col., 2007), basándose en la morfología y en las características inmunohistológicas del tumor, reconoce nueve tipos de tumores del tejido neuroepitelial; entre ellos, derivados de un progenitor glial común, se distinguen tres tipos más frecuentes de gliomas: tumores astrocíticos, tumores oligodendrogiales y tumores oligoastrocíticos (mixtos). Más del 80 % de los gliomas diagnosticados pertenecen a uno de

estos tres tipos histológicos. Los criterios para el diagnóstico de gliomas se basan además en patrones histopatológicos de desdiferenciación, anaplasia y malignidad, que se definen por características como densidad celular, atipia nuclear, presencia de figuras mitóticas y necrosis, lo que permitirá establecer el grado.

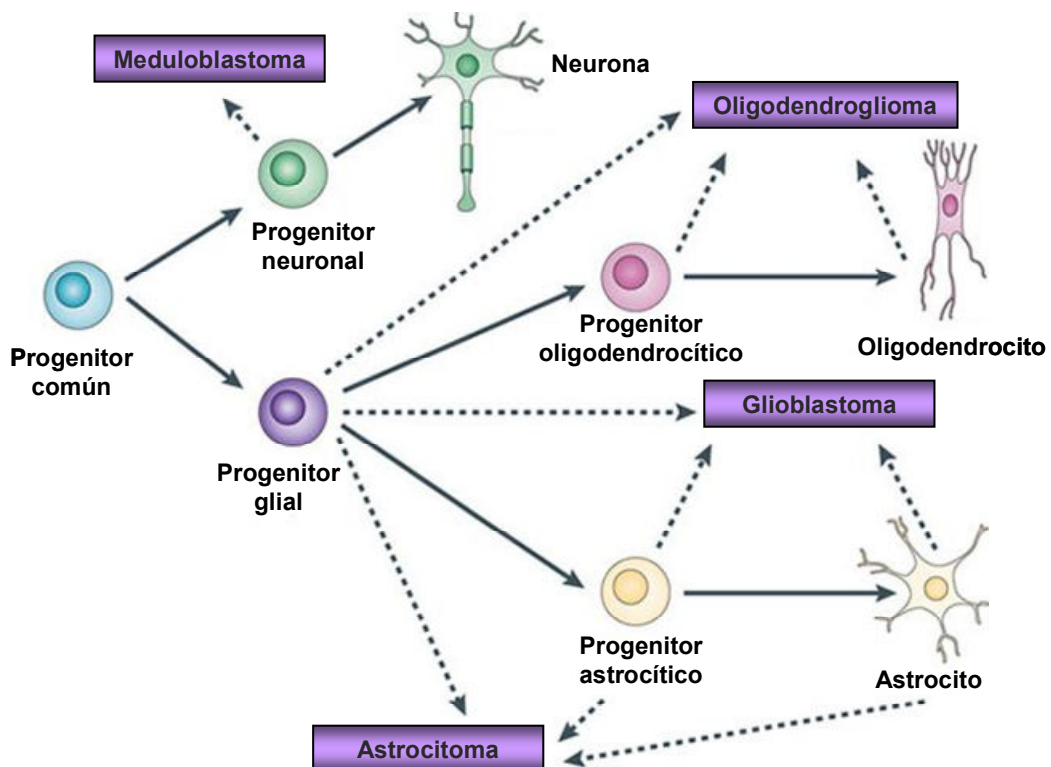


Figura 1. Árbol genealógico neuroglial. Las células concretas a partir de las que se produce la gliomagénesis son aún desconocidas, se representa una selección de posibles candidatos (líneas discontinuas). Adaptado de Huse y Holland (*Nat. Rev Gen.*, 2010).

Entre los tumores **astrocíticos** destacan:

- **Astrocitoma pilocítico (grado I)**, circunscrito y de crecimiento lento, se da con mayor frecuencia en niños y jóvenes. La mayoría de los pacientes sobreviven más de 20 años después del diagnóstico. Supone el 5 % de los gliomas.
- **Astrocitoma difuso (grado II)**, con tres variantes: fibrilar, gemistocítico y protoplásmico. Se da principalmente en pacientes jóvenes y tiene tendencia a evolucionar hacia grados superiores; los astrocitomas gemistocíticos son los más susceptibles de malignizar. La supervivencia es muy variable, con una media entre 5 y 10 años. Su frecuencia es menor del 2 % entre los gliomas.
- **Astrocitoma anaplásico (grado III)**, astrocitoma maligno que puede derivar de un difuso o aparecer *de novo*, en ambos casos tiende a progresar. La edad media de desarrollo de este tipo de tumor es de unos 40 años y su frecuencia entre los gliomas es casi del 7%. La supervivencia media para estos pacientes es de 2 a 3 años.
- **Glioblastoma (grado IV)**, puede generarse a partir de un astrocitoma de grado II o III (glioblastoma secundario), pero en más del 90 % de los casos se produce *de novo* (glioblastoma primario). Son dos tipos muy diferenciados, tanto en el perfil molecular como en las vías oncogénicas (Ohgaki & Kleihues, 2005). Hay dos variantes histológicas: glioblastoma de células gigantes y gliosarcoma. El glioblastoma, además de ser el tipo de tumor intracraneal más agresivo, es también el más frecuente, suponiendo más del 50 % de los casos de glioma. Dos criterios importantes para el diagnóstico son la proliferación vascular y la presencia de necrosis. Suele darse en adultos y presenta un pico de incidencia entre los 50 y los 60 años de edad. Es el tipo de peor pronóstico, con una supervivencia media de entre 10 y 12 meses.

Los tumores **oligodendrogliales** representan entre el 5 y el 18 % de los tumores gliales y pueden ser de dos subtipos histológicos en función del grado:

- **Oligodendroglioma (grado II)**. Su tendencia a la malignización es frecuente, pero no tan acusada como en los astrocitomas. La supervivencia media se sitúa entre los 10 y 15 años.
- **Oligodendroglioma anaplásico (grado III)**, generalmente primario, con características histológicas de malignidad focales o difusas. Los pacientes diagnosticados con oligodendrogliomas tienen mejor pronóstico que los que presentan astrocitomas, siendo la supervivencia media en este tipo de entre 5 y 10 años.

Los **oligoastrocitomas** presentan un doble componente, oligodendrogliar y astrogliar, que puede estar o no entremezclado; son, por tanto, un tipo especialmente heterogéneo de glioma. En función del grado se dividen en:

- **Oligoastrocitoma (grado II)**.
- **Oligoastrocitoma anaplásico (grado III)**.
- Su pronóstico es equiparable al oligodendroglioma en el caso del grado II y algo peor para los oligoastrocitomas de grado III, siendo la media de supervivencia de este tipo de entre 3 y 5 años (Belda-Iniesta y col., 2006; Idoate & Echeveste, 2007).

Los astrocitomas, oligodendrogliomas, oligoastrocitomas anaplásicos y glioblastomas son denominados colectivamente gliomas malignos, mientras que los gliomas de grado I y II se denominan comúnmente gliomas de bajo grado.

La distinción entre bajos y altos grados de gliomas, entre morfología oligodendrogliar y astrocítica o incluso entre gliomas y astrocitosis reactivas no es tarea fácil, especialmente en biopsias con poco tejido tumoral. Así, la gradación derivada de la combinación de estos parámetros no coincide, en algunos casos, con el comportamiento biológico del tumor y su respuesta a terapia (van den Bent, 2010).

Otro problema añadido es la heterogeneidad intratumoral, que puede ser causa de errores en la gradación. En algunas ocasiones, en función del tamaño de la resección o de las características de la biopsia, el patólogo no puede tener la certeza de estar estudiando una muestra representativa del tumor; por este motivo es necesario realizar el diagnóstico a partir de las áreas de mayor grado de agresividad histológica, principalmente en tumores de alto grado, en los que la heterogeneidad es más marcada. Además, sería importante tener en cuenta los datos radiológicos, ya que pueden aportar información que se pierde al tomar biopsias insuficientemente representativas.

Estos datos sugieren que son necesarios nuevos marcadores moleculares, tanto para hacer una caracterización más exhaustiva de cada tipo tumoral, que pueda ayudar a entender mejor los mecanismos de génesis tumoral y a definir mejor el pronóstico, como para estratificar de una forma más adecuada cada subgrupo de pacientes que puedan beneficiarse de una terapia determinada (Hartmann y col., 2011; Jones & Holland, 2011; Rich & Bigner, 2004; Verhaak y col., 2010).

1.2 Alteraciones moleculares en gliomas

En los últimos 20 años, estudios citogenéticos y de genética molecular han identificado un buen número de aberraciones cromosómicas y de alteraciones génicas en gliomas, de modo que se han descrito múltiples vías intracelulares alteradas. Así, cabe destacar la presencia de alteraciones o pérdida de genes supresores de tumores tales como *TP53*, *RB*, *NF1*, *PTEN* o *CDKN2A* y alteraciones en oncogenes como *EGFR*, *VEGF* y *PDGFR*.

Recientemente, dentro del proyecto del consorcio The Cancer Genome Atlas (TCGA), se han generado series de datos multidimensionales para catalogar las alteraciones del cáncer. Precisamente la primera neoplasia estudiada por esta red de grupos fue el glioblastoma. Analizaron la expresión, el número de copias y el estado de metilación de 12.042 genes en 206 glioblastomas, la mayor parte primarios. En 143 de éstos, que tenían muestras pareadas de tejido sano o sangre periférica, secuenciaron además 601 genes seleccionados (Cancer Genome Atlas Research, 2008). En este estudio confirmaron la presencia de las alteraciones frecuentemente descritas en glioblastomas, como activación de la familia de *EGFR*,

alteraciones en *PTEN*, en la vía de *CDKNA* y mutaciones en *TP53*, entre otras, aunque encontraron otras alteraciones recurrentes en genes como *NF1*, *PARK2* o *AKT3*, algunas descritas menos frecuentemente hasta entonces.

Las mutaciones en el gen supresor de tumores *TP53* fueron por primera vez implicadas en la gliomagénesis hace más de 20 años, debido a un incremento del desarrollo de gliomas en pacientes con síndrome de *Li-Fraumeni*, un desorden poco frecuente que predispone a la carcinogénesis y es causado por mutaciones en este gen (Srivastava y col., 1990). Posteriormente, fueron descritas como característica frecuente en tumores astrocíticos de bajo grado y en glioblastomas secundarios (Louis, 1994). Sin embargo, la gran cantidad de alteraciones que pueden darse en este gen y la gran variedad de consecuencias que resultan de éstas, junto con el hecho de que su valor clínico en gliomas sigue generando controversia, lo convierten en un marcador de poca utilidad clínica (Kapoor y col., 2007; Watanabe y col., 1997).

La amplificación del gen del receptor de crecimiento epidérmico (*EGFR*), situado en *7p12*, es el cambio genético más frecuente en glioblastomas primarios, se ha descrito en aproximadamente el 40-50 % de éstos, mientras que en glioblastomas secundarios es poco frecuente (Ohgaki & Kleihues, 2007). La amplificación de *EGFR* resulta generalmente en la sobreexpresión del receptor tirosín-kinasa transmembrana *EGFR*, que puede conferir una activación constitutiva independiente de ligando, con el consecuente aumento de la señalización de vías como *MAPK* y *PI3K/Akt*, transmitiendo así estímulos de supervivencia celular, proliferación, angiogénesis, capacidad invasiva y resistencia a la apoptosis (Yarden & Sliwkowski, 2001). La desregulación de *EGFR* también puede producirse como consecuencia de otras alteraciones, como sobreproducción autocrina de ligando o modificaciones intrínsecas de la estructura del receptor debidas a la presencia de mutaciones en el gen.

Una de las mutaciones que se da frecuentemente en glioblastomas, generalmente asociada a la amplificación de *EGFR*, es la que da lugar a la variante III de *EGFR* (*EGFRvIII*), que consiste en una delección de los exones del 2 al 7 del gen; la proteína resultante carece de dominio extracelular de unión al ligando y es constitutivamente activa. Casi la mitad de los tumores

con sobreexpresión de EGFR presentan esta variante y solamente se encuentra en el 10 % de los tumores sin amplificación de *EGFR*. Algunos estudios han demostrado que la presencia de EGFRvIII confiere un aumento de la proliferación e invasividad a las células de glioma, sin embargo, el papel de la sobreexpresión de EGFRvIII en el pronóstico de pacientes con glioblastoma tampoco ha sido establecido (Montano y col., 2011).

La sobreexpresión del factor de crecimiento derivado de plaquetas (*PDGF*) y de su receptor (*PDGFR*) está asociada con gliomas de bajo grado y glioblastomas secundarios (Kesari & Stiles, 2006). La desregulación del receptor se produce, en algunos casos, por la amplificación y reordenamiento del locus *4q12*, donde se encuentra el gen que codifica las cadenas α de esta proteína. En tumores con amplificación de *PDGFRA* es frecuente la presencia de una variante con delección de los exones 8 y 9, que codifican parte del dominio extracelular, la proteína resultante es constitutivamente activa, de forma semejante a la variante III en el caso de *EGFR* (*EGFRvIII*); también se ha encontrado un gen de fusión entre el gen de la tirosín-kinasa *KDR* y *PDGFR* (Ozawa y col., 2010). La activación de la vía de *PDGFR* por estos mecanismos, por mutaciones puntuales en el receptor o por sobreexpresión del ligando contribuye a la gliomagénesis (Brennan y col., 2009; Verhaak y col., 2010), revisado en (Nazarenko y col., 2012).

La proteína *Phosphatase and Tensin Homolog (PTEN)* es una fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa codificada en humanos por el gen *PTEN*, que se sitúa en la región cromosómica *10q23*. Este gen fue identificado como gen supresor de tumores por su alta tasa de mutación en varios tipos tumorales, es uno de los genes más frecuentemente delecionados, principalmente en glioblastoma primario y tumores de mama y próstata (Li y col., 1997). Esta fosfatasa está implicada en la regulación del ciclo celular, impidiendo que las células crezcan y se dividan demasiado rápido. Regula negativamente los niveles de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato y funciona como supresor de tumores mediante regulación negativa de la vía *Akt/PKB*, cuya importancia es crítica para la angiogénesis, proliferación celular y supervivencia.

La pérdida del locus *9p21.3*, donde se encuentra *CDKN2A* (inhibidor de kinasa dependiente de ciclina 2A) es frecuente en gliomas y puede afectar a la expresión tanto de *RB* como de *TP53* conduciendo a la gliomagénesis (Jones & Holland, 2011; Rich & Bigner, 2004).

Las mutaciones en el gen *NF1* predisponen a la formación de gliomas, ya que estos tumores forman parte del espectro de tumores que se desarrollan en pacientes con neurofibromatosis tipo 1, enfermedad causada por alteraciones en este gen. En los estudios de secuenciación masiva, realizados por la red de cáncer *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), se encontró que un buen número de glioblastomas, no relacionados con este síndrome, presenta mutaciones en este gen o deleciones focales en hemicigosis en el locus *17q11.2*, que lo contiene (Cancer Genome Atlas Research, 2008; Parsons y col., 2008). La proteína codificada, neurofibromina, es un regulador negativo de la vía oncogénica *Ras*, por lo que su pérdida tiene como consecuencia un aumento de la señalización en esta vía, que conduce a la producción de señales de crecimiento, angiogénesis y proliferación.

Otras alteraciones moleculares descubiertas más recientemente también pueden tener importante valor diagnóstico, pronóstico o predictivo de respuesta a terapia. Es el caso de la presencia de mutaciones en el gen *IDH1* y de la metilación en el promotor de *MGMT*.

En un estudio de secuenciación a gran escala, en muestras de tumores gliales, Parsons y col. (2008) secuenciaron 20661 genes codificantes de proteínas en 22 muestras humanas de este tipo tumoral. Este estudio llevó a la caracterización de una serie de genes alterados en gliomas que no habían sido descritos previamente. El ejemplo más importante fue el descubrimiento de mutaciones en el gen *IDH1*, que encontraron solamente en el 12% de las muestras, pero relacionadas con un aumento de la supervivencia y asociadas al subtipo secundario de glioblastoma. Éste es uno de los estudios que demuestra la utilidad de los análisis genómicos no dirigidos, ya que la región cromosómica en la que se encuentra *IDH1* es una de las más estables en gliomas, de modo que con los estudios basados en el análisis de zonas con alteraciones cromosómicas recurrentes no se hubiera identificado (Parsons y col., 2008).

Gran número de estudios posteriores han analizado las características de los gliomas con mutaciones en *IDH1* (Hartmann y col., 2011; Hartmann y col., 2010; Lai y col., 2011; Lu y col., 2012; Sanson y col., 2009; von Deimling y col., 2011). Esta alteración parece ser un evento temprano en el desarrollo de algunos tipos de glioma, está relacionada con astrocitomas de bajo grado (excepto en astrocitoma pilocítico, en el que no se da esta alteración), oligodendrogliomas y glioblastomas secundarios, lo que sugiere un predecesor neural común para estos tipos tumorales, diferente del que da lugar a glioblastomas primarios. Este hecho, hace que sea el marcador más importante para diferenciar gliomas difusos de grado II, excluyendo otros tipos como ependimomas, astrocitomas pilocíticos y lesiones no tumorales que histológicamente pueden ser difíciles de diferenciar, así como glioblastomas primarios y secundarios. Además, la presencia de mutaciones en *IDH1* define un grupo de gliomas con un comportamiento menos agresivo (Watanabe y col., 2009; Yan y col., 2009), revisado en (Ohgaki & Kleihues, 2013).

El gen *IDH1* se localiza en el cromosoma 2, en la región *2q32-qter*, codifica el enzima isocitrato deshidrogenasa citosólica, que cataliza la descarboxilación oxidativa de isocitrato a α -cetoglutarato con la reducción de NADP^+ a NADPH. Las mutaciones en este gen se producen casi siempre en la posición R132, localizada en el exón 4, que corresponde al sitio activo del enzima. El cambio aminoacídico más frecuente es R132H, se da en más del 90% de los casos, pero también se han descrito R132C, R132S, R132G y R132L (*Catálogo de Mutaciones Somáticas en Cáncer, COSMIC, Sanger Institute*). Como consecuencia de la mutación disminuye la actividad normal del enzima y se produce la adquisición de una nueva actividad, la reducción de α -cetoglutarato a D-2-hidroxiglutarato, con la oxidación simultánea de NADPH. Los cambios conformacionales en el sitio activo hacen que aumente su afinidad por el α -cetoglutarato, por lo que, además de producirse D-2-hidroxiglutarato, el descenso de α -cetoglutarato y NADPH. Una de las consecuencias parece ser un aumento de los niveles de HIF-1 α y el transporte del heterodímero HIF-1 (que se compone de las subunidades HIF-1 α y HIF-1 β) al núcleo, donde induce la transcripción de genes implicados en angiogénesis, invasión y metabolismo energético (Zhao y col., 2009). Otra de las hipótesis en relación al papel de la mutaciones en *IDH1/2*, es que éstas inducen tumorigénesis mediante una

desregulación epigenética a lo largo de todo el genoma. El análisis de las alteraciones en la metilación de 272 glioblastomas, pertenecientes a la serie del TCGA, reveló un patrón de hipermetilación de islas CpG en un gran número de loci; este fenotipo metilador fue confirmado en otra serie de glioblastomas y gliomas de bajo grado, más asociado a estos últimos y estrechamente ligado a la presencia de mutación en *IDH1*. (Noushmehr y col.).

Las mutaciones en *IDH1* parecen estar estrechamente asociadas con el grado tumoral, dándose con mayor frecuencia en gliomas de bajo grado, a excepción del astrocitoma pilocítico, que no presenta esta alteración. Este hecho, hace que sea el marcador más importante para diferenciar gliomas difusos de grado II, excluyendo otros tipos, como ependimomas y lesiones no tumorales, además de los astrocitomas pilocíticos, que histológicamente pueden ser difíciles de diferenciar (Watanabe y col., 2009; Yan y col., 2009).

Además de las alteraciones genéticas, los cambios epigenéticos también han sido propuestos como marcadores pronósticos y predictivos de respuesta a terapia. Es el caso de la metilación del promotor de *MGMT*, que conlleva a un silenciamiento de este gen. La proteína codificada es la DNA O⁶-MGMT (metil-guanil-metil-transferasa), que elimina los grupos alquilo de las posiciones O⁶ de la guanina y O⁴ de la timina, restituyendo estas bases y evitando la muerte celular inducida por agentes alquilantes como dacarbacina, procarbocina y temozolomida, entre otros. El grupo alquilo eliminado es transferido a una cisteína en la posición 145 del propio enzima, que en este estado es marcado para ser degradado; así, la actividad de MGMT depende directamente de su producción.

El gen *MGMT*, situado en la posición *10q26*, consta de 5 exones y una isla rica en CpG de 763 pb, con 98 sitios CpG situados en el promotor y en el primer exón, también hay una pequeña zona promotora y una zona potenciadora en la isla CpG. En células normales, los sitios CpG no están metilados, pero en muchos tumores, en la mayoría de estos sitios, la cisteína porta un grupo metilo que incrementa la afinidad por proteínas de unión al DNA, estas proteínas alteran la estructura cromatínica, de modo que se impide la unión de factores de transcripción y la expresión de *MGMT*. En la mayoría de los casos el silenciamiento de *MGMT* está asociado

con la metilación en sitios específicos (Esteller y col., 1999; von Deimling y col., 2011). Diversos estudios han demostrado una mayor resistencia de los gliomas con silenciamiento de *MGMT* a agentes alquilantes (Hegi y col., 2005; Stupp y col., 2009; Weller y col., 2009). Sin embargo, en otros estudios, la observación de que pacientes con oligodendroglioma anaplásico o glioblastoma e hipermetilación de *MGMT* tratados sólo con radioterapia han mostrado las mismas ventajas en la supervivencia que aquéllos tratados con radioterapia y quimioterapia basada en PCV, ha sembrado dudas respecto al papel de este enzima en la reparación del daño en el DNA inducido por radioterapia. De este modo, la metilación en este gen podría ser sólo el reflejo de un estado de hipermetilación genómica, que es lo que finalmente conferiría mejor pronóstico (van den Bent y col., 2009; van den Bent y col., 2011; Wick y col., 2009). También se ha planteado la hipótesis de que los beneficios en la supervivencia puedan ser conferidos por otras alteraciones, que se encuentran generalmente asociadas a ésta, como la co-delección 1p/19q o la presencia de mutaciones en *IDHI* (Labussiere y col., 2010; van den Bent y col., 2011).

La codelección 1p19q resulta de una translocación centromérica o pericentromérica desequilibrada entre los cromosomas 1 y 19 $t(1;19)(q10;p10)$, que tiene como consecuencia la pérdida estas regiones cromosómicas (Cairncross & Jenkins, 2008; Jenkins y col., 2006). Ya en 1992 von Deimling y col. demostraron la existencia de pérdidas en la región 19q en diferentes gliomas (von Deimling y col., 1992). Posteriormente, Cairncross y col. demostraron que los pacientes con oligodendroglioma anaplásico, con pérdida de 1p, responden casi siempre a quimioterapia basada en procarbina, lomustina y vincristina (PCV) y que los pacientes con tumores que portan la codelección 1p/19q, en ausencia de otras alteraciones detectables, tienen una respuesta a quimioterapia más duradera (Cairncross y col., 1998).

La pérdida de 1p/19q está estrechamente asociada con el subtipo oligodendroglioma y se presenta, principalmente, en aquéllos con características morfológicas clásicas, como presencia de núcleo redondeado, vasculatura ramificada frágil y microcalcificaciones. (McDonald y col., 2005). Su presencia puede ayudar a diferenciar éste de otros tipos

tumorales. Incluso en el tipo mixto puede contribuir a discriminar aquéllos tumores que tendrán un comportamiento más parecido a los de tipo oligodendroglial.

Además del importante número de alteraciones genéticas detectadas en los gliomas, y que afectan a las principales vías de señalización intracelular de receptores de tirosin kinasas, de regulación del ciclo celular mediante RB y p16, y p53, en los últimos años se han llevado a cabo intentos de clasificación de los gliomas mediante estudios globales de expresión de genes, que comentaremos brevemente a continuación.

1.3 Clasificaciones de los gliomas basados en estudios de expresión génica

En 2004, Freije y col. llevaron a cabo un análisis de expresión de genes a gran escala en una serie de 85 gliomas difusos infiltrantes que incluía todos los tipos histológicos. Con el fin de establecer una clasificación basada en estos perfiles de expresión, independiente de la histología, que pudiera utilizarse para determinar el pronóstico, describieron una lista de 44 genes cuyo perfil de expresión tenía una correlación con la supervivencia mayor que la clasificación histológica o la edad (Freije y col., 2004).

De la misma forma, Phillips y col. (Phillips y col., 2006) identificaron una serie de genes cuya expresión relacionaron con un incremento de la supervivencia y clasificaron una serie de gliomas de alto grado en función de la expresión de estos genes. El análisis identificó 3 grupos marcadamente diferenciados, caracterizados principalmente por la expresión diferencial de 35 genes, que pueden ser utilizados para realizar un agrupamiento jerárquico. Las subclases resultantes fueron designadas como proneural, proliferativa y mesenquimal. Este esquema de clasificación parece tener valor pronóstico independiente del grado tumoral y de la presencia de necrosis, variable que se correlaciona con supervivencia. Sin embargo, estas subclases presentan una fuerte asociación con el grado tumoral y con la edad del paciente.

Aunque este estudio ha sido el primero en utilizar los términos proneural, proliferativo y mesenquimal, estas categorías son similares a las propuestas por el trabajo de Freije y cols. Sin embargo, el grado de correlación es difícil de determinar, debido a la utilización de metodología distinta en diferentes series de muestras.

El subtipo proneural está compuesto tanto por gliomas de grado III como por glioblastomas, con y sin necrosis y los pacientes cuyos tumores se engloban en este grupo se caracterizan por una edad media menor que la del resto y mayor supervivencia. Los subtipos proliferativo y mesenquimal incluyen principalmente glioblastomas con necrosis. En estos grupos se da con mayor frecuencia la amplificación del cromosoma 7 junto con la pérdida del cromosoma 10, combinación de alteraciones clásicamente asociada a glioblastomas. Así como estos grupos se caracterizan por alteraciones que producen activación en vías relacionadas con la proliferación celular y la angiogénesis, en el grupo proneural se da sobreexpresión de miembros de la vía Notch y otros marcadores moleculares relacionados con la neurogénesis. Este estudio muestra que los subtipos transcripcionales recuerdan estadios clave de la neurogénesis, en los que están implicadas vías de señalización que juegan papeles cruciales en su regulación y en el control de la agresividad tumoral.

Verhaak y col., dentro del estudio del consorcio The Cancer Genome Atlas (Verhaak y col., 2010) analizaron la expresión de 1740 genes en 200 muestras tumorales y 2 cerebros normales. El análisis factorial de esta información definió 4 subtipos moleculares: Clásico, Mesenquimal, Proneural y Neural. Los resultados fueron validados en una serie de 250 glioblastomas utilizando la información de los genes más representativos de cada grupo.

El subtipo clásico se caracteriza por amplificación del cromosoma 7 y pérdida del cromosoma 10. En este grupo, se observa una amplificación alta de *EGFR* en el 97 % de los casos, que no es frecuente en los otros subtipos. El 55 % presentan, además, mutaciones en *EGFR*, incluyendo la variante *EGFRvIII*. Otras alteraciones que caracterizan este subtipo son la ausencia de mutaciones en *TP53* y la pérdida de la región cromosómica 9p21.3, donde se localiza *CDKN2A*. En el 94 % de los casos, la pérdida de este gen se da asociada a la amplificación de *EGFR* y es excluyente con alteraciones en otros componentes de la vía Retinoblastoma (RB), por lo que parece ser que en los casos con amplificación focal de *EGFR* la vía RB sólo se ve afectada a través de *CDKN2A*. El subtipo clásico se caracteriza además por una alta expresión de las vías de señalización Notch y Sonic Hedgehog, así como de marcadores de células madre y precursores neurales, como la nestina.

Las alteraciones moleculares que caracterizan el subtipo mesenquimal son principalmente deleciones focales en hemicigosis en *17q11.2*, donde se localiza el gen *NFI*, la mayoría de las muestras aquí clasificadas presentan bajos niveles de expresión de este gen. En el 50 % de los casos con pérdida de *NFI*, ésta va acompañada de pérdida de *PTEN*, combinación que fuera de este grupo sólo se da en un caso. En este subtipo hay expresión de marcadores mesenquimales como YLK40 y MET. La combinación de una elevada actividad de marcadores mesenquimales y astrocíticos, que se da en este subtipo, es una reminiscencia de la transición epitelio-mesénquima que se ha relacionado con tumores desdiferenciados y transdiferenciados. También se da alta expresión de miembros de la vía del factor de necrosis tumoral y de NF- κ B, probablemente como consecuencia de la alta extensión de zonas de necrosis e infiltrados inflamatorios que se da en estos tumores.

Las dos características principales de la subclase proneural son la presencia de mutaciones en *IDH1* y de alteraciones en *PDGFRA*. Las amplificaciones focales en el locus *4q12*, que contiene este gen, se dan en todos los subtipos de glioblastoma, pero principalmente en éste, siendo característica sólo de este grupo la concomitancia de la amplificación con una alta expresión del gen. La mayoría de las muestras con alteraciones en *PDGFRA* no presentaron mutación en *IDH1*. También son frecuentes las mutaciones en *TP53* o la pérdida de heterocigosidad del locus. El evento clásico de glioblastomas, que consiste en la amplificación del cromosoma 7 junto con la pérdida del cromosoma 10, es menos prevalente en este grupo, aun así se da en el 54 % de las muestras. El subtipo proneural muestra gran expresión de genes propios del desarrollo oligodendrocitario, lo que apoya el hecho de que es un subgrupo atípico de glioblastomas. Está relacionado con una edad media menor y una tendencia a un incremento de la supervivencia respecto al resto de los subtipos.

El subtipo neural fue tipificado por la expresión de marcadores neuronales. Las categorías ontológicas asociadas a éste incluyen proyección neuronal y transmisión sináptica. Los dos casos de tejido cerebral normal fueron incluidos en este grupo.

Respecto a la respuesta al tratamiento, se evaluó el efecto de la terapia definida como agresiva, consistente en quimio y radioterapia concomitante o más de tres ciclos seguidos de quimioterapia, en comparación con ciclos no concurrentes o ciclos cortos de quimioterapia. Los subtipos clásico y mesenquimal demostraron un incremento significativo de la supervivencia de los pacientes sometidos al tratamiento más agresivo, que en el subtipo neural mostró tendencia a conferir beneficio. Sin embargo, en el subtipo proneural, una mayor agresividad en el tratamiento no reportó beneficio alguno. Cabe destacar que el estado dicotómico de metilación de *MGMT*, relacionado con la respuesta al tratamiento, no está asociado con ninguno de los subgrupos, repartiéndose por igual entre ellos.

Las características de los subtipos tumorales se asemejan a los distintos tipos celulares neurales, lo que sugiere un nexo a diferentes células de origen. También es posible la existencia de una única célula de origen común (Galli y col., 2004) y que los diversos subtipos sean el resultado de diferentes vías de diferenciación, sin embargo, la existencia de células con potencial proliferativo y alteraciones como amplificación de *EGFR* o *PDGFRA* (Jackson y col., 2006) sugiere la existencia de múltiples poblaciones con capacidad precursora.

Aunque la generación masiva de nuevos datos moleculares parece complicar la subclasificación de los gliomas, este tipo de estudios no sólo es importante para ampliar el conocimiento sobre las características intrínsecas de cada tipo tumoral y poder determinar su origen celular, sino que también está proporcionando una idea más clara de las rutas patogénicas clave, cuyo análisis puede predecir respuesta a terapias dirigidas y aportar conocimiento sobre las vías que pueden proporcionar nuevas dianas terapéuticas.

En una revisión reciente del tema (Huse y col., 2011) se llevó a cabo una comparación de los subtipos de Phillips y de Verhaak. La reclasificación de la serie del TCGA, según el esquema de Phillips y colaboradores, resultó en una concordancia completa para el subtipo mesenquimal y buena para el subtipo proneural. La mayoría de las muestras catalogadas como neurales se correspondieron con el subtipo proneural y algunas de ellas con el proliferativo. Las muestras del grupo clásico se distribuyeron por igual entre las subclases proneural, proliferativa y mesenquimal. En la clasificación a la inversa, la concordancia de los subtipos

proneural y mesenquimal se mantiene, aunque algunas de las muestras del subtipo proneural se segregan al subtipo neural. El subtipo proliferativo se reparte entre los grupos proneural y mesenquimal.

El perfil proneural predomina en las muestras de glioma de bajo grado y glioblastomas secundarios, mientras que el perfil molecular mesenquimal aparece más relacionado con glioblastomas primarios, por lo que parece ser que los 2 subgrupos transcripcionales más firmemente establecidos están relacionados con 2 mecanismos distintos de gliomagénesis

Además, otros estudios indican, por un lado, que el contenido en células que presentan el marcador de pluripotencialidad neural CD133, en muestras resecadas de glioblastomas, es diferente en función del subtipo (Chen y col., 2010) y, por otro lado, que los genes que definen la distinción entre el subtipo mesenquimal y proneural están diferencialmente expresados en tumores que presentan diferente realce en las imágenes de resonancia magnética, característica que también está relacionada con el pronóstico (Pope y col., 2008).

Una cuestión clave, sobre los subtipos transcripcionales, es hasta que punto están determinados por las alteraciones genéticas y epigenéticas o si su segregación está dirigida por la célula de origen. Las evidencias hasta ahora descritas apoyan ambas hipótesis, las firmas moleculares de astrocitomas pilocíticos y ependimomas varían en función de su localización (Carro y col., 2010) lo que sugiere que la célula que los origina puede repercutir en la firma molecular de cada subtipo tumoral. Otro ejemplo son los glioblastomas con mutaciones en *IDH1*, cuyos perfiles moleculares se corresponden mayoritariamente con el patrón del subtipo proneural y su localización tiende a ser en el lóbulo frontal (Lai y col., 2011).

Por tanto, cada subtipo transcripcional constituiría una entidad diferente, generada probablemente por un tipo celular distinto y como consecuencia de diversos eventos moleculares.

Sin embargo, la evaluación de perfiles moleculares también presenta algunas limitaciones importantes como la diferente representación tumoral en las muestras en función del tamaño del tumor y del tipo de resección. De este modo, en un tumor pequeño localizado de forma que no permita la resección total, no se puede obtener información sobre zonas que pueden aportar

diferencias importantes, especialmente zonas invasivas difusas, que no se pueden reseca. Además, el análisis basado en la homogeneización del tejido agrava aspectos de la heterogeneidad tumoral, como la incapacidad de diferenciar la información procedente de tejidos no tumorales como el estroma parenquimal y las células inflamatorias y vasculares.

1.4 Implicación de los microRNAs en el desarrollo y mantenimiento tumoral

Desde su descubrimiento en 1993 (Lee y col., 1993) los microRNAs (miRNAs) han ido cobrando importancia a medida que se ha ido ampliando el conocimiento sobre sus funciones, de hecho, constituyen una de las clases más abundantes de moléculas reguladoras en organismos multicelulares. El descubrimiento del silenciamiento post-transcripcional de RNA mensajeros, por estos pequeños RNAs, fue un paso imprescindible para el conocimiento del control de la información génica (Fire y col., 1998).

Los microRNAs son moléculas de RNA no codificante, de entre 17 y 25 nucleótidos, que se unen a secuencias complementarias de las zonas 3' UTR de sus RNAs mensajeros diana, impidiendo su traducción o marcándolos para su destrucción. Hasta la fecha, se ha confirmado la existencia de más de 1000 microRNAs en humanos y cada uno de ellos puede tener cientos de dianas. Muchos microRNAs están muy conservados entre especies, así como varios de los componentes de su maquinaria de procesamiento (Bentwich y col., 2005).

La mayor parte están localizados en regiones intrónicas de genes codificantes o no codificantes, el resto están organizados en clusters, generalmente como unidades policistrónicas; el transcrito generado se fragmenta posteriormente en los precursores de microRNA que lo componen. Sin embargo, los niveles relativos de los microRNAs del mismo cluster varían en función del momento del desarrollo y de la homeostasis, lo que sugiere la existencia de otros mecanismos de regulación de la expresión de estos microRNAs.

En cuanto a los microRNAs incluidos en intrones, la mayoría tiene la misma orientación que el gen en el que se localiza y son transcritos como parte del RNA mensajero de éste. También se han descrito microRNAs situados en exones (Bartel, 2004; Eulalio y col., 2008).

La biogénesis de los microRNAs implica la maduración de sus precursores y su ensamblaje en unidades procesadoras y reguladoras. Inicialmente, su transcripción es llevada a cabo por la RNA polimerasa II, que genera un transcrito de unos 60-70 nucleótidos que se pliega en horquilla debido a la presencia de zonas complementarias. Este microRNA bicatenario primario (pri-miRNA) es procesado en el núcleo por el complejo formado por el enzima RNasa III *Drosha* y la proteína de unión a DNA de doble hebra DGCR8 (Lee y col., 2003). El resultado es un microRNA precursor (pre-miRNA), que es transportado activamente al citoplasma a través de la exportina 5 y posteriormente procesado por el complejo formado por la endonucleasa RNasa III *Dicer* y la proteína de unión a RNA de doble hebra responsable de la transactivación TRBP. Se genera una molécula de RNA de doble hebra de unos 22 nucleótidos, este dúplex se desenrolla y una de las hebras (hebra guía) es incorporada al complejo de silenciamiento inducido por RNA, RISC (figura 2), cuya formación también es inducida por *Dicer*. El componente activo del complejo RISC es una endonucleasa de la familia Argonata (Ago 2) que corta la hebra de RNA mensajero complementaria la hebra del miRNA asociada al complejo (Gregory y col., 2006; Lund y col., 2004).

Generalmente, sólo una de las hebras es incorporada al complejo, la selección se realiza principalmente en función de su estabilidad termodinámica y de la posición del pliegue en el pre-miRNA; la otra hebra (hebra anti-guía o pasajera) suele degradarse, se denomina con un asterisco (miRNA*) por su baja concentración en la célula (menor o igual al 15 %), en relación con su complementaria. En algunos casos, ambas hebras son incorporadas por igual al complejo RISC y se convierten en miRNAs funcionales con diferentes dianas, se denominan entonces 3p y 5p en función del brazo del pre-miRNA del que procedan. Los microRNAs se designan con las letras “mir”, para los precursores, o “miR” para los microRNAs maduros, unidas a identificadores numéricos secuenciales. Se utilizan también prefijos de 3 o 4 letras para designar la especie. Por ejemplo, hsa-miR-101 corresponde al microRNA maduro 101 de

Homo sapiens, mientras que mmu-mir-101 es el precursor del microRNA 101 de *Mus musculus*. Los microRNAs designados con el mismo número en diferentes especies han de ser ortólogos. Las secuencias parálogas, cuyos microRNAs maduros difieren solamente en 1 o 2 nucleótidos, se denominan con una letra como sufijo; por ejemplo hsa-miR-10a y hsa-miR-10b. En algunas ocasiones, secuencias situadas en diferentes partes del genoma dan lugar a microRNAs maduros idénticos, en ese caso se utiliza un número como sufijo para su designación. Por ejemplo, los pre-miRNAs hsa-mir-194-1 y hsa-mir-194-2 dan lugar al mismo microRNA maduro, hsa-miR-194, pero están localizados en diferentes loci (Griffiths-Jones y col., 2006).

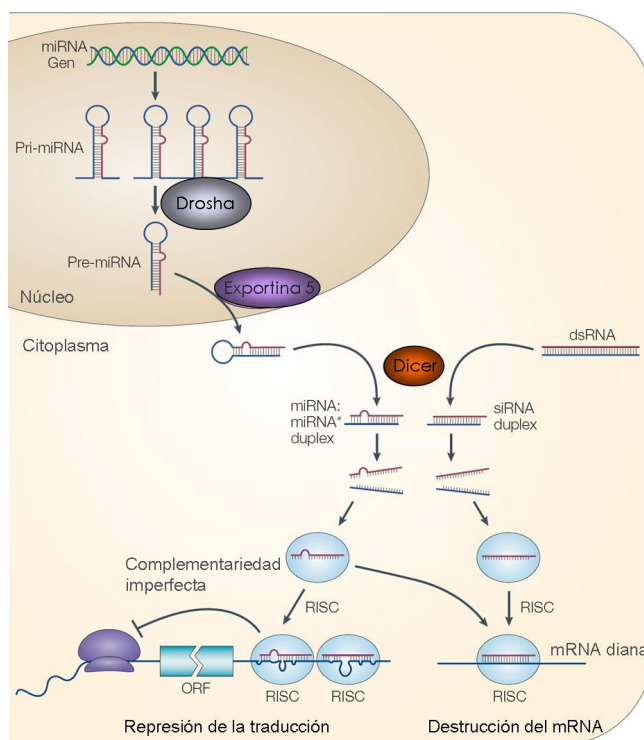


Figura 2. Modelo propuesto de la biogénesis y de la represión post-transcripcional ejercida por los microRNAs y los RNAs de interferencia. Adaptado de He y Hannon (*Nat Rev. Genet.*, 2004).

Los microRNAs maduros regulan sus genes diana en función del grado de complementariedad con las regiones 3' UTR del RNA mensajero, si ésta es perfecta, se produce su destrucción directa. Si hay nucleótidos desapareados, la regulación se lleva a cabo principalmente por impedimento de la traducción, pero también puede reducirse la cantidad de RNA mensajero. Otro mecanismo descrito es el secuestro de los RNAs mensajeros a lugares diferenciados en el citoplasma (foci), denominados cuerpos de procesamiento de RNA mensajero o "cuerpos P" (Liu y col., 2005a) La especificidad y la función de los microRNAs están determinadas por los nucleótidos del 2 al 7 del extremo 5' del miRNA maduro, esta región es denominada semilla y debe tener complementariedad exacta con el RNA diana.

Un único gen puede estar regulado por muchos microRNAs y éstos, a su vez, pueden estar regulados de forma independiente por promotores específicos, incluyendo p53, c-Myc y EF2 o incluso por hipermetilación (Lujambio y col., 2007; Zhao y col., 2005). Por otra parte, aunque la destrucción del RNA mensajero o el bloqueo de su traducción regulan negativamente la expresión génica, algunos estudios han mostrado que los microRNAs pueden producir un aumento de la expresión de sus genes diana (Vasudevan y col., 2007).

La expresión de microRNAs es altamente específica de tejido y de tipo celular; la regulación que ejercen participa en casi todos los procesos biológicos, por lo que su alteración está implicada en el desarrollo de muchas enfermedades, entre ellas el cáncer. Numerosos genes para microRNAs están localizados en regiones cromosómicas frágiles, sometidas a reordenamientos y roturas que producen pérdida de heterocigosidad, deleciones y amplificaciones, alteraciones que están relacionadas con la carcinogénesis (Calin y col., 2004). La capacidad de los microRNAs de controlar numerosas vías y la frecuencia con la que se producen alteraciones en su regulación o en su biogénesis, los convierte en potenciales indicadores de pronóstico e instrumento para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

Dada su especificidad, la expresión diferencial de microRNAs en tumores también podría constituir una herramienta útil en la clasificación molecular de los gliomas. En 2005, Lu y col. (Lu y col., 2005) analizaron 217 miRNAs en 334 muestras que incluían varios tipos de cáncer humano y encontraron sus perfiles de expresión sorprendentemente informativos en relación con la línea de desarrollo y el estado de diferenciación de los tumores. Además, observaron perfiles de expresión que reflejaban distintos mecanismos de transformación, por ejemplo, según los patrones de expresión de microRNAs las muestras de leucemia aguda se dividían en 3 grupos que se correspondían con 3 tipos diferentes de leucemias, caracterizados por reordenamientos distintos (BCR-ABL, TEL-AML1 y MLL). En general, la expresión de microRNAs en los tumores mostraba una marcada reducción en comparación con los tejidos sanos correspondientes.

Por otra parte, el análisis de los perfiles de expresión de microRNAs en otros tumores humanos no sólo ha mostrado diferencias entre el tumor y el tejido sano correspondiente, sino que también ha identificado patrones tumorales específicos relacionados con el diagnóstico, grado, progresión, pronóstico y respuesta al tratamiento (Calin & Croce, 2006).

2. OBJETIVOS

El presente proyecto se originó en el ámbito hospitalario del Laboratorio de Oncología Molecular, en el Hospital Universitario Central de Asturias, al constatar el interés de los clínicos y los patólogos por encontrar nuevos marcadores que permitieran superar las dificultades que existen en la caracterización y clasificación diagnóstica de los tumores cerebrales. Dada la heterogeneidad de SNC, una clasificación adecuada de los tumores de origen glial, que se corresponda con el pronóstico del paciente y su respuesta a terapia, es un reto que, a pesar de los grandes avances en los últimos años, está por alcanzar.

Con el precedente de los estudios recientes, que han sugerido la existencia de alteraciones moleculares que podrían ser más informativas que los criterios histopatológicos sobre el pronóstico del paciente y su respuesta a terapia y los estudios derivados del trabajo de Lu y col. en los que se demostraba que los microRNAs eran específicos de tejido y sus perfiles de expresión servían para clasificar tumores humanos (Lu y col., 2005), establecimos para nuestro trabajo los siguientes objetivos:

1. Análisis de alteraciones genéticas y epigenéticas representativas de las vías intracelulares desreguladas en tumores gliales, determinación de su frecuencia en cada tipo tumoral y estudio de la correlación existente entre ellas y los datos clínicos de los pacientes, en una muestra representativa de tumores de origen glial procedente de nuestro Hospital, con el fin de determinar cuáles pueden tener mayor relevancia como biomarcadores.
2. Comparación de los patrones de expresión de microRNAs entre gliomas y tejido cerebral normal y establecimiento de una clasificación molecular de los tumores gliales basada en los perfiles de expresión de microRNAs.
3. Caracterización biológica de los grupos de gliomas definidos por expresión diferencial de microRNAs y estudio de su correlación con las variables clínico-patológicas y moleculares, con el fin de conocer si esta clasificación permite mejorar la estadificación tumoral, el conocimiento del origen celular y el pronóstico de estos tumores.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Pacientes y muestras

Se seleccionaron 129 muestras de glioma, de tejido fresco o conservado en congelación a -80°C del Banco de Tumores del HUCA, pertenecientes a pacientes diagnosticados entre 2001 y 2011. Se utilizaron también 6 muestras control de tejido cerebral proveniente de donantes de órganos sin historial clínico de patología cerebral y una muestra de RNA comercial de cerebro sano (Ambion, Austin, Tx, USA). Los cortes histológicos de las muestras en congelación, teñidos con hematoxilina-eosina, fueron revisados por dos patólogos del Servicio de Anatomía Patológica del HUCA para corroborar el diagnóstico inicial según los criterios que establece la OMS (Louis y col., 2007) y asegurar un grado de conservación y un porcentaje tumoral aceptables para la realización de los análisis moleculares. Todas las muestras utilizadas tienen más del 70% de células tumorales. Además, se utilizaron 23 muestras de tejido de pacientes diagnosticados en 2005 y 2006, 16 de ellos cedidos por el Hospital Virgen Blanca de León y 6 por el Hospital Clínic de Barcelona. Entre los 152 gliomas, 88 fueron clasificados como glioblastoma multiforme (GBM), 33 como astrocitoma (AST), 24 como oligodendroglioma (ODG) y 7 como oligoastrocitoma (OA).

Se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes, aprobado por el comité de ética del HUCA, para el almacenamiento y utilización de las muestras con fines de investigación. El presente proyecto de investigación fue aprobado asimismo por la Dirección del HUCA.

Se recogió la información clínico-patológica de los pacientes referente a la edad, sexo, extensión de la resección tumoral y tratamiento post cirugía. Los datos relacionados con la extensión de la resección fueron obtenidos a partir de estudios radiológicos (resonancia magnética entre 24h y 4 semanas después de la cirugía). Las imágenes postquirúrgicas fueron revisadas comparando imágenes de resonancia magnética potenciada en T1 con gadolinio para las lesiones de alto grado y potenciadas en T2 para los casos de bajo grado (Henson y col., 2008; Sanai & Berger, 2008). La resección tumoral fue clasificada como total (sin tumor visible por resonancia magnética) o subtotal (resección parcial o biopsia).

El tratamiento post-cirugía fue clasificado en 4 tipos. El grupo A incluye los pacientes sometidos a radioterapia y temozolomida concomitante y adyuvante (Stupp y col., 2005). En el grupo B se incluyen los pacientes que recibieron radioterapia seguida de quimioterapia, principalmente basada en procarbina, lomustina y vincristina (PCV) (Levin y col., 1990), o basada en temozolomida. Los pacientes englobados en el grupo C recibieron sólo radioterapia como tratamiento post-quirúrgico. El tratamiento estándar de radioterapia consiste en un régimen de 60 Gy de radiación total fraccionada en aproximadamente 33 sesiones, a lo largo de 6 semanas. Por último, el grupo D incluye pacientes que no recibieron ningún tratamiento adicional post-quirúrgico, así como un pequeño número de pacientes sometidos a tratamientos dirigidos no estandarizados, con o sin radioterapia.

Como dato de supervivencia se tomó el tiempo transcurrido desde la cirugía hasta la fecha de *exitus* o de cierre del estudio (mayo de 2012) en los casos de supervivencia. En los casos censurados por pérdida de seguimiento se tomó la fecha de la última revisión del paciente en consulta. La última muestra recogida es de diciembre de 2011 de modo que el seguimiento mínimo fue de 5 meses.

3.2 Extracción de ácidos nucleicos

Se extrajo RNA a partir de un cilindro de entre 20 y 100 mg de tejido, mediante el reactivo comercial Tri-reagent® (Ambion), que se basa en el método de Chomczynski y Sacchi (Chomczynski & Sacchi, 1987). El DNA genómico se obtuvo a partir de la fase fenólica resultante tras la extracción del RNA, siguiendo las especificaciones del fabricante. La concentración final de RNA y DNA se determinó por medición de la absorbancia a 260nm en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific, Wilmington, Delaware USA).

Para la obtención de cDNA, a partir del RNA extraído, se utilizó la retrotranscriptasa Im Prom-II™ (Promega Corporation, Madison, WI, USA). Se utilizaron 0.4 µmoles de hexámeros aleatorios como cebadores (Fermentas®, Thermo Scientific, Wilmington, Delaware USA) y 1µg de RNA total, en un volumen final de 20µL.

3.3 Amplificación mediante PCR y análisis de secuencia

Para la detección de mutaciones en el exón 4 del gen *IDHI* se amplificó mediante PCR la región donde se localizan. Se utilizaron los oligonucleótidos 5'-CACCAAATGGCA CCATACGA y 5'-CACCAAATGGCACCATACGA en condiciones estándar, con una temperatura de hibridación de 62 °C, a partir de 300 ng de DNA genómico, con 10 µmoles de dNTPs, 20 µmoles de cada oligonucleótido y 2 unidades de Taq polimerasa, en un volumen final de 50 µL; se llevaron a cabo en termocicladores ABI9700 (Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA) y Mastercycle egradient (Eppendorf, Hamburg, Germany). El resultado de la reacción se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa con tinción Real Safe (Real, Durviz S.L.U) y los fragmentos producidos se purificaron con el kit ATP™ Gel/PCR fragments Extraction (ATP biotech Inc., Taiwan R.O.C.), según el protocolo facilitado por la casa comercial.

Las reacciones de secuenciación se efectuaron con el kit Big Dye Terminator® v1.1 (Applied Biosystems), con 10 ng del producto de PCR purificado, en un volumen final de 10 µL, según el protocolo estándar. El resultado se analizó mediante electroforesis capilar en un secuenciador automático ABIPrism310 (Applied Biosystems) con software SeqScape.

Para la determinación de la delección que da lugar a la variante III de *EGFR* (*EGFRvIII*) se amplificó a partir del cDNA, la zona completa donde se produce la delección. Se utilizaron los oligonucleótidos 5'-CTTCGGGGAGCAGCGATGCGAC y 5'-ACCAATACCTAT TCCGTTACAC en condiciones estándar de PCR, con una temperatura de hibridación de 62 °C. Cuando existe esta alteración, se produce un fragmento de 200 pares de bases, mientras que en el resto de los casos, el fragmento resultante es de 1000 pares de bases. La visualización del resultado se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio o Real Safe.

3.4 Análisis de metilación del promotor de *MGMT*

Para detectar metilación en el promotor del gen *MGMT*, se trató el DNA genómico con bisulfito sódico, que modifica las citosinas no metiladas convirtiéndolas en uracilos (Herman y col., 1996). La PCR específica de metilación se llevó a cabo a partir de 1.2 µL de DNA modificado, utilizando parejas de oligonucleótidos para la amplificación del alelo no metilado para la amplificación del alelo con metilación (Esteller y col., 2000). Se utilizaron 0.3 unidades de enzima INMOLASE DNA Polimerasa (Bioline, London U.K.) con una concentración 1.5mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs y 0.2 µM de cada oligonucleótido, en un volumen final de 15 µL. La reacción de PCR se realizó en el termociclador ABI9700 (Applied Biosystems). Como control positivo de metilación se utilizó DNA de la línea celular de leucemia promielocítica HL60 y como control negativo se utilizó la línea celular de cáncer de colon RKO. El resultado de la amplificación se comprobó en un gel de agarosa al 2 % con tinción Real Safe, dando por positivos los casos en los que se detecta fragmento amplificado en la PCR específica de metilación, independientemente de la intensidad de la banda. Todos los casos fueron revisados por dos personas de forma independiente.

3.5 Análisis de alteraciones génicas mediante MLPA

Se utilizaron los kits p105, p088, p081 y p082 (MRC-Holland, Amsterdam, Netherland). El kit p105 permite analizar alteraciones en los genes *EGFR*, *CDKN2A*, *PTEN* y *TP53*, situados en 7p12, 9p21, 10q23 y 17p13.1 respectivamente. El kit p088 está diseñado para la detección de pérdidas en las regiones cromosómicas 1p y 19q y los kits p081 y p082 se utilizaron para el análisis del número de copias del gen *NFI*, localizado en la región 17q11.2. Todos los kits incluyen sondas que hibridan en regiones de control para la normalización y validación del resultado.

El procedimiento experimental se llevó a cabo según el protocolo estándar; de forma resumida, se desnaturalizó el DNA (aprox. 350 ng) y se dejó hibridar con la mezcla de sondas específicas a 60 °C durante 16 horas, posteriormente, se realizó la ligación de las sondas hibridadas mediante una ligasa estable a alta temperatura (Ligase-65, MRC-Holland). Tras la inactivación del enzima, parte de esta mezcla de ligación se amplificó mediante PCR con una

pareja de oligonucleótidos complementarios a la secuencia universal, presente en todos los cebadores usados en la hibridación/ligación. Uno de los oligonucleótidos está marcado con un fluoróforo, de forma que los fragmentos generados se pueden analizar mediante electroforesis capilar. En nuestro caso se utilizó un instrumento ABIPrism310 (Applied Biosystems).

La cuantificación de la amplificación o delección de las regiones genómicas en estudio, en cada muestra tumoral, se realizó mediante el cálculo de una relación que permite corregir las variaciones introducidas a lo largo del procedimiento experimental, principalmente en la cantidad de DNA inicial. Así, los datos se normalizan al comparar la amplificación generada por la hibridación de sondas utilizadas como controles en la muestra tumoral con la amplificación de esas sondas en muestras de DNA control.

La relación final que permite conocer la amplificación o delección para cada pareja de sondas específicas utilizadas, es la siguiente:

$$\frac{\text{Área pico "n" en muestra tumoral} / \text{área pico "n" muestra normal}}{\sum \text{áreas picos control en muestra tumoral} / \sum \text{áreas picos control muestra normal}}$$

En concordancia con otras publicaciones (Jeuken y col., 2006), el umbral para la detección de pérdidas y ganancias génicas se sitúa en 0.8 y 1.2 respectivamente (con una desviación estándar, entre réplicas, menor del 20%).

En el caso de la determinación de amplificación de *EGFR*, en el que se observaron diferentes grados de amplificación, se categorizó la variable en 4 grupos, tomando como límites los ratios 1.2, 2 y 20. Así, un ratio menor de 1.2 se consideró no amplificación; un ratio entre 1.2-2, amplificación baja; un ratio entre 2-20, amplificación moderada y >20 amplificación alta.

3.6 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos de los parámetros clínico-patológicos y de las variables moleculares estudiadas se llevaron a cabo con el paquete estadístico SPSS v15.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL). Para el estudio de la supervivencia en función de las variables analizadas en el tejido tumoral, se utilizó el método de Kaplan-Meier. La comparación de los tiempos de supervivencia para análisis univariante se realizó mediante los métodos de Log-Rank y regresión de Cox simple. El análisis multivariante se llevó a cabo mediante regresión de Cox múltiple (Adelante: RV).

Los test de independencia para las variables moleculares se llevaron a cabo mediante tablas de contingencia, utilizando el estadístico exacto de Fisher. En todos los casos se consideraron significativos los valores de $p \leq 0.05$, siendo todos los test bilaterales.

3.7 Análisis de expresión de microRNAs en tejido

El análisis de la expresión de microRNAs se llevó a cabo a partir del RNA total extraído con el reactivo TriReagent® (Ambion) de las muestras tumorales conservadas en congelación. La retrotranscripción (RT) y su posterior análisis mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RQ-PCR) se realizaron utilizando el sistema Multiplex RT for TaqMan® Array Human MicroRNA Panel v1.0 (Applied Biosystems). Este sistema está compuesto por tarjetas microfluidicas de 384 pocillos, precargados con ensayos basados en sondas TaqMan® de expresión de microRNAs. Están preparadas para el análisis de expresión de 366 microRNAs mediante cuantificación relativa, utilizando el método de ddCt, en el equipo 7900HT Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems). Es necesario realizar 8 RTs por cada muestra, una por cada pool diferente de oligonucleótidos que contiene los microRNAs situados en los 48 pocillos de cada puerto. Una vez cargados los puertos, la tarjeta se centrifuga para que el contenido de éstos se reparta a cada uno de los 384 pocillos. Posteriormente se realiza un sellado y se recorta la pieza con los puertos de carga. Cada PCR se realiza en un volumen total de 1 μ L. La tarjeta incluye 2 normalizadores por puerto y dos pocillos vacíos en total.

La RT y la RQ-PCR se llevaron a cabo según el protocolo establecido. Brevemente, la RT se realizó en un volumen final de 10 μ L, con 100 ng de RNA total, 1 μ L del pool correspondiente de oligos (10X Multiplex™ RT Human primer pool), 0.2 μ L de dNTPs con dTTP (100 mM), 1 μ L de buffer de RT, 2 μ L de transcriptasa reversa MultiScribe™ (50 U/ μ L) y 0.125 μ L de inhibidor de RNAsas (20 U/ μ L). La reacción se realizó en un termociclador ABI 9700 (Applied Biosystems), utilizando el modo de emulación 9600; se llevó a cabo una incubación a 16 °C durante 30' y a 42 °C durante 30' seguida de una inactivación del enzima a 85 °C durante 5'. El cDNA sintetizado se estabilizó a 4 °C durante, al menos, 2' y se utilizó inmediatamente o se almacenó a -20 °C. Para cada puerto de la tarjeta se utilizaron 50 μ L de una dilución 1/61.5 de cDNA y 50 μ L de TaqMan® Universal PCR Master Mix; para la RQ-PCR se utilizaron las condiciones estándar del equipo, tal y como recomienda la casa comercial.

3.8 Análisis de los datos de RQ-PCR de microRNAs en tejido

Los datos de expresión de microRNAs generados por RQ-PCR se analizaron con los programas StatMiner® (Integromics, Granada, España) y Partek® Genomics Suite™ (PartekGS) versión 6.5 (Partek Inc., St. Louis, MO). Los resultados comparativos generados por el programa StatMiner®, mediante test Limma (modelo lineal para datos de matrices organizadas), se ajustaron para evaluar la significación mediante el método de corrección de datos múltiples (FDR) de Benjamini-Hochberg. Se consideraron valores significativos de p ajustada aquellos iguales o inferiores a 0,05. La normalización se llevó a cabo utilizando los datos de expresión del RNA pequeño nucleolar *RNU48*.

Para el análisis de las categorías biológicas en las que están implicados los microRNAs con expresión diferencial se utilizó el programa TAM: *Tool for annotations of microRNAs* (Lu y col., 2010).

4. RESULTADOS

4.1 Características clínico-patológicas de los pacientes y las muestras tumorales

El número de muestras analizadas fue de 152 gliomas: 88 glioblastomas (GBMs), 33 astrocitomas (ASTs), 24 oligodendrogliomas (ODGs) y 7 oligoastrocitomas (OAs), pertenecientes a pacientes con edades comprendidas entre 23 y 81 años (mediana de edad = 58). El tipo histológico y el grado fueron determinados según el criterio de los patólogos del departamento de Anatomía Patológica del HUCA, basados en la clasificación que establece la OMS (Louis y col., 2007). La distribución de las características clínico-patológicas de los pacientes se detalla en la Tabla 1.

La media de edad al diagnóstico (IC 95%) fue de 49 años (41,4-56,6) en los tumores de grado II; 53 años (48,6-57,5) en los tumores de grado III y 60 años (58,5-62,8) en los tumores de grado IV. La edad de los pacientes diagnosticados de tumores de grado IV resultó significativamente mayor que la de aquellos diagnosticados de tumores de grados II y III ($p < 0,001$ y $p = 0,003$ respectivamente). El sexo, la resección tumoral y el tipo histológico no mostraron diferencias significativas de frecuencia en función del grado.

4.2 Análisis de alteraciones moleculares: distribución de frecuencias y correlación con subtipos histológicos y grado tumoral

Como primera aproximación a la caracterización molecular de los tumores gliales de este estudio, analizamos una serie de alteraciones que se han ido describiendo a lo largo de los últimos años como probables biomarcadores, con posible valor pronóstico o de toma de decisiones terapéuticas, o incluso para apoyo diagnóstico. Así, hemos analizado las alteraciones en el número de copias de los genes *EGFR*, *PTEN*, *CDKN2A* y *TP53*, el estado de metilación del promotor de *MGMT* y la presencia de mutación en *IDHI* en las 152 muestras de glioma. Adicionalmente, estudiamos la pérdida de las regiones cromosómicas 1p y 19q en todos los oligodendrogliomas y en 36 de los glioblastomas. La selección de los glioblastomas para el estudio de esta alteración se basó, principalmente, en la existencia de lesión previa (tumor secundario) y en la presencia de componente oligodendroglial en la descripción

anatomopatológica. La variante *EGFRvIII* se analizó en 129 de las muestras y el número de copias de *NFI* en 56. La frecuencia de todas las alteraciones moleculares encontradas, en función del grado y del tipo tumoral, se detalla en la Figura 3 y en la Tabla 2.

Tabla 1. Características clínico-patológicas de los pacientes estudiados y sus tumores (n = 152). Distribución de frecuencias.

	Grado tumoral (OMS)			Total (%)	p
	Frecuencia (%)				
	II n=14 (9,2 %)	III n=50 (32,9 %)	IV n=88 (57,9 %)		
Sexo					
Mujer	6 (42,9)	18 (36,7)	37 (45,1)	61 (42,1)	0,63
Varón	8 (57,1)	31 (63,3)	45 (54,9)	84 (57,9)	
ND	-	1 (2)	6 (6,8)	7 (4,6)	
Resección tumoral					
Total	6 (54,5)	17 (39,5)	33 (45,2)	56 (44,1)	0,63
Subtotal	5 (45,5)	26 (60,5)	40 (54,8)	71 (55,9)	
ND	3 (21,4)	7 (14)	15 (17)	25 (16,4)	
Tratamiento post-cirugía					
A	-	-	22 (29,7)	22 (17,7)	<0,001
B	-	32 (80)	18 (24,3)	50 (40,3)	
C	6 (60)	2 (5)	17 (23)	25 (20,2)	
D	4 (40)	6 (15)	17 (23)	27 (21,8)	
ND	4 (28,6)	10 (20)	14 (15,9)	28 (18,4)	
Subtipo histológico					
ODG	5 (35,7)	19 (38)	-	24 (15,8)	0,43
AST	6 (42,9)	27 (54)	-	33 (21,7)	
OA	3 (21,4)	4 (8)	-	7 (4,6)	
GBM	-	-	88 (100)	88 (57,9)	
Estado					
Vivos	8 (66,7)	15 (38,5)	14 (18,7)	37 (29,4)	0,0016
Exitus	4 (33,3)	18 (46,2)	57 (76)	79 (62,7)	
Pérdida de seguimiento	0	6 (15,4)	4 (5,3)	10 (7,9)	
ND	2 (14,3)	11 (22)	13 (14,8)	26 (17,1)	

Tratamiento: A: radioterapia y quimioterapia concomitante y adyuvante; B: radioterapia y quimioterapia concomitante o no; C: radioterapia; D: otros. Significación estadística p < 0,05. Test estadístico de Fisher para contingencia de la relación variable-grado. ND: Información no disponible.

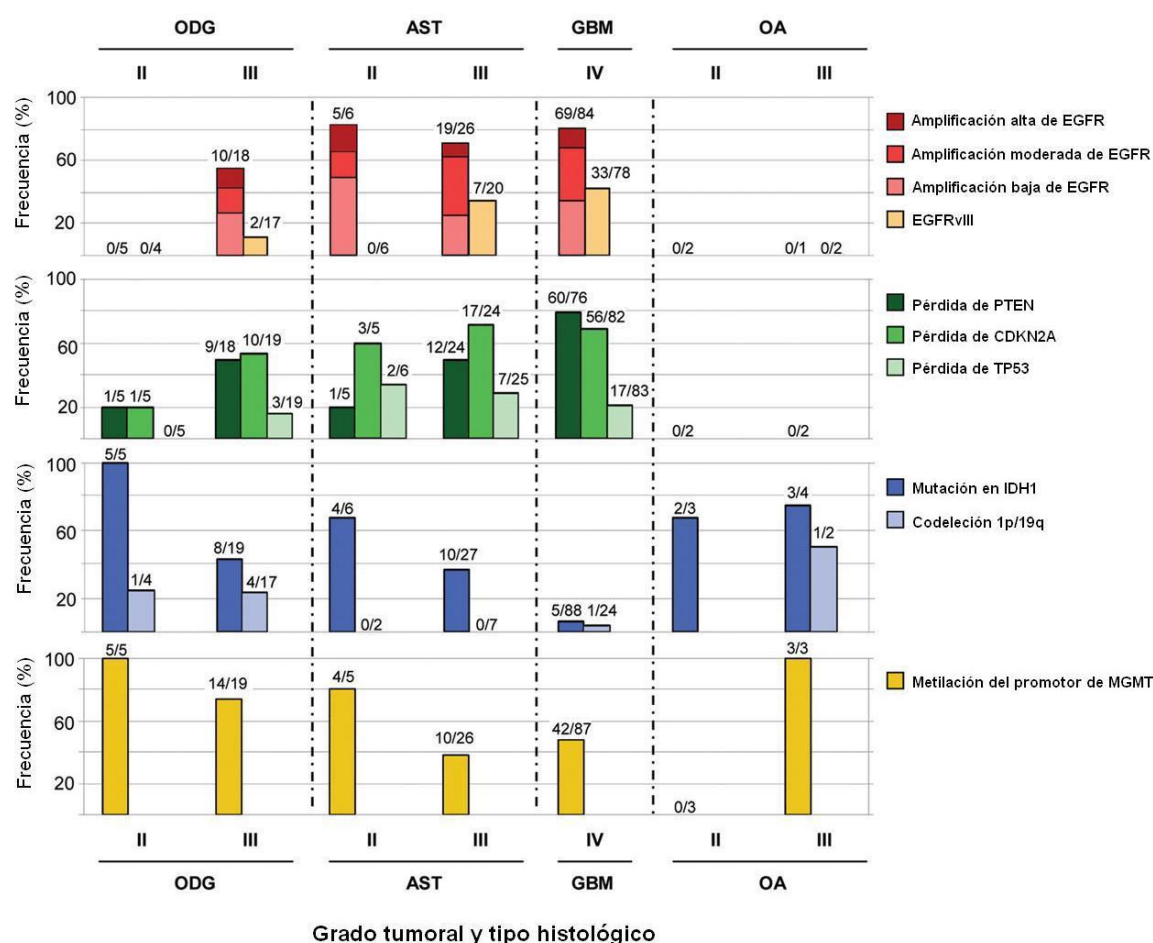


Figura 3. Distribución de los casos en función del grado y tipo histológico según sus alteraciones moleculares.

Como puede observarse, la amplificación de *EGFR* constituye la alteración más frecuente, presente en el 72,5% de las muestras; esta alteración se correlaciona con el grado tumoral y con el tipo histológico, de modo que es más frecuente en tumores de mayor grado ($p = 0,0015$) y en el subtipo histológico astrocitoma, en comparación con el subtipo oligodendroglioma (75% vs. 43,5%; $p = 0,025$). La delección que da lugar a la variante III de *EGFR* (*EGFRvIII*) se encontró en el 32,6% de los casos analizados. Esta alteración presenta una correlación directa con el grado tumoral ($p = 0,0023$), siendo más frecuente en glioblastomas (42%), mientras que su frecuencia en astrocitomas es del 27% y en oligodendrogliomas del 9,5%.

Tabla 2. Distribución de los casos, clasificados por grado, en función de sus alteraciones moleculares

	Grado tumoral (OMS)			Total (%)	p
	Frecuencia (%)				
	II n=14 (9,2 %)	III n=50 (32,9 %)	IV n=88 (57,9 %)		
Amplificación de EGFR					
sí	5 (38,5)	29 (64,4)	69 (82,1)	103 (72,5)	0,0015
no	8 (61,5)	16 (35,6)	15 (17,9)	39 (27,5)	
ND	1 (7,1)	5 (10)	4 (4,5)	10 (6,6)	
EGFRvIII					
sí	-	9 (23,1)	33 (42)	42 (32,6)	0,0023
no	12 (100)	30 (76,9)	45 (57,7)	87 (67,4)	
ND	2 (14,3)	11 (22)	10 (11,4)	23 (15,1)	
Pérdida de PTEN					
sí	2 (16,7)	21 (47,7)	60 (78,9)	83 (62,9)	<0,0001
no	10 (83,3)	23 (52,3)	16 (21,1)	49 (37,1)	
ND	2 (14,3)	6 (12)	12 (13,6)	20 (13,2)	
Pérdida de CDKN2A					
sí	4 (33,3)	27 (60)	56 (68,3)	87 (62,6)	0,06
no	8 (66,7)	18 (40)	26 (31,7)	52 (37,4)	
ND	2 (14,3)	5 (10)	6 (6,8)	13 (8,6)	
Pérdida de TP53					
sí	2 (15,4)	10 (20)	17 (20,5)	29 (20,4)	0,69
no	11 (84,6)	36 (72)	66 (79,5)	113 (79,6)	
ND	1 (7,1)	4 (8)	5 (5,7)	10 (6,6)	
Metilación de MGMT					
sí	9 (69,2)	27 (56,3)	42 (48,3)	78 (52,7)	0,34
no	4 (30,8)	21 (43,8)	45 (51,7)	70 (47,3)	
ND	1 (7,1)	2 (4)	1 (1,1)	4 (2,3)	
Mutación en IDH1					
sí	11 (78,6)	21 (42)	5 (5,7)	37 (24,3)	<0,0001
no	3 (21,4)	29 (58)	83 (94,3)	115 (75,7)	
ND	-	-	-	-	
Codeleción 1p/19q					
sí	1 (16,7)	5 (19,2)	1 (4,2)	7 (12,7)	0,19
no	5 (83,3)	21 (80,8)	23 (95,8)	49 (87,3)	
ND	8 (57,1)	24 (48)	64 (72,7)	96 (63,2)	
Pérdida de NF1					
sí	-	-	9 (23,1)	9 (16,1)	0,099
no	4 (100)	13 (100)	30 (76,9)	47 (83,9)	
ND	10 (71,4)	37 (74)	49 (55,7)	96 (63,2)	

Significación estadística p<0,05 Test estadístico de Fisher para contingencia de la relación variable-grado. ND: Información no disponible.

La pérdida de *PTEN* se detectó en el 63% de los casos, demostrando, al igual que en los casos de amplificación de *EGFR* y de la presencia de variante *EGFRvIII*, correlación directa con el grado del tumor ($p < 0,0001$). Su frecuencia en glioblastomas es del 78,9 % y en cuanto al tipo histológico en tumores de grado II y III, la pérdida de *PTEN* se da por igual en astrocitomas (44,8%) y oligodendrogliomas (43,5%). La pérdida del locus *CDKN2A*, que codifica las proteínas p14^{ARF} y p16^{INK4A}, es una alteración frecuente que apareció en el 63 % de los tumores. Su frecuencia muestra tendencia estadística ($p = 0,06$) a aumentar con el grado pero las diferencias en la distribución de frecuencias entre los diferentes tipos histológicos no son significativas. La pérdida de *TP53* se encontró en el 20,4%, de los casos informativos, con frecuencia similar en todos los grados. Las diferencias entre glioblastomas, astrocitomas y oligodendrogliomas no fueron estadísticamente significativas.

El promotor de *MGMT* presentó metilación en 78 de los 148 casos que fueron valorables (52,7 %), con una frecuencia similar en todos los grados y en los diferentes grupos de tratamiento. En cuanto al tipo tumoral, se da con mayor frecuencia en oligodendrogliomas (79%) que en el resto de los tipos ($p = 0,034$).

En el análisis de *IDHI* detectamos mutaciones puntuales que dan lugar a cambio de aminoácido en la posición R132 en el 24% de las muestras; el cambio fue de arginina a histidina (R132H) en el 92%, mientras el 8% restante comprende 1 cambio a leucina (R132L), 1 cambio a cisteína (R132C) y 1 cambio a glicina (R132G). La presencia de mutación en *IDHI* muestra correlación inversa con el grado tumoral ($p < 0,0001$), siendo más frecuente en tumores de bajo grado. La distribución de la frecuencia de la mutación entre astrocitomas y oligodendrogliomas fue similar, con un 42,4 % de mutantes entre los astrocitomas y un 54,2 % entre los oligodendrogliomas. En los gliomas mixtos, 5 de los 7 casos (71,4 %) presentaron mutación. Entre los tumores de tipo glioblastoma sólo encontramos 5 casos con esta alteración (5,7 %), de los que 3 eran glioblastomas secundarios y 2 no tenían evidencia registrada de lesión previa. Además, las mutaciones en este gen se dieron con mayor frecuencia en pacientes de menor edad ($p < 0,001$).

Todos los tumores diagnosticados como oligodendrogliomas se analizaron para el estudio de la pérdida de las regiones cromosómicas 1p y 19q. Obtuvimos resultados válidos en 21 de las 24 muestras. De forma adicional, analizamos 9 astrocitomas, 24 glioblastomas y 2 oligoastrocitomas. La pérdida de la región cromosómica 1p se encontró en 9 de las 56 muestras analizadas; 7 de éstas presentaban también pérdida de 19q completa y en las dos restantes se detectó pérdida parcial de 19q. Por tanto, la frecuencia de la pérdida completa de 1p y 19q fue del 12,74 %. Probablemente debido al bajo número de casos positivos, no hay diferencias significativas en las distribuciones de frecuencias, en función del grado ni del tipo; sin embargo, 5 de las 7 muestras con delección completa son oligodendrogliomas (71,43 %).

En relación a las correlaciones de las alteraciones moleculares entre sí, podemos destacar que en los tumores de grado II y III, la mayoría de los casos que tienen mutación en *IDHI* no presentan amplificación de *EGFR* ($p < 0,001$) ni pérdida de *PTEN* ($p < 0,001$). Además, la mutación en *IDHI* está presente en todos los casos en los que se detecta codelección de 1p y 19q ($p = 0,024$), así como en la mayoría de los casos con metilación de *MGMT* ($p = 0,001$). La amplificación de *EGFR* muestra correlación directa con la pérdida de *PTEN* ($p < 0,001$) y de *CDKN2A* ($p = 0,016$) e inversa con la metilación del promotor de *MGMT* ($p = 0,03$). La variante *EGFRvIII* aparece más frecuentemente en casos con pérdida de *CDKN2A* ($p = 0,024$). Por su parte, la pérdida de *PTEN* muestra correlación directa con la pérdida de *CDKN2A* ($p = 0,002$) e inversa con la pérdida de las regiones cromosómicas 1p y 19q (Tabla 1 de anexo).

En el grupo de tumores de grado IV se observa un menor número de correlaciones entre las variables moleculares analizadas. La amplificación de *EGFR* tiende a aparecer junto con la pérdida de *PTEN* ($p = 0,033$) y muestra correlación inversa con la presencia de mutación en *IDHI* ($p = 0,038$). Esta mutación presenta, además, correlación inversa con la pérdida de *CDKN2A* ($p = 0,044$) y correlación directa con la metilación del promotor de *MGMT* ($p=0,023$) (Tabla 2 de anexo).

4.3 Análisis de supervivencia en relación con las variables clínicas y moleculares

Tras una primera caracterización de las alteraciones moleculares descritas en los gliomas, procedimos a analizar el posible valor pronóstico de estas variables a partir de los datos clínicos a los que tuvimos acceso. El análisis de supervivencia se llevó a cabo con 126 pacientes con tumores primarios. El curso clínico de estos pacientes en función del grado tumoral se representa en la Figura 4.

El número de pacientes con tumores de grado II fue insuficiente para realizar análisis estadísticos, y por tanto no fueron incluidos en estudios posteriores. Por otra parte, tomamos los subgrupos de tumores de grado IV y de grado III como series independientes, ya que presentaron diferencias de supervivencia estadísticamente significativas ($p = 0,007$).

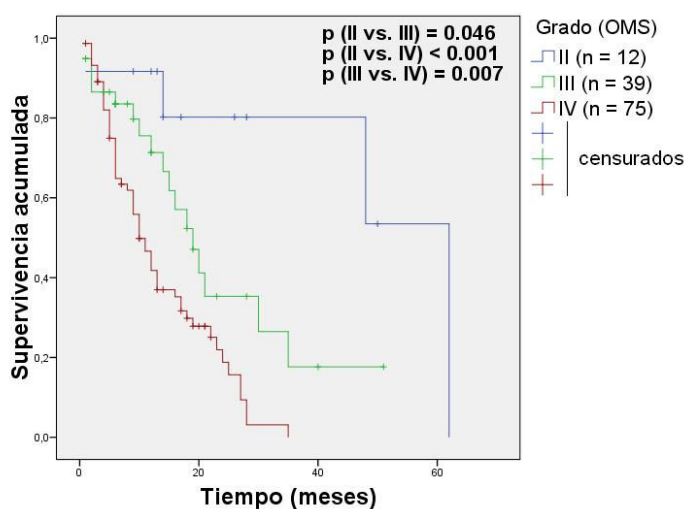


Figura 4. Curvas de supervivencia correspondientes a los pacientes con glioma, estratificación en función del grado tumoral (OMS).

4.3.1 Análisis de supervivencia: tumores de grado IV

Hemos podido analizar los datos de supervivencia de 75 pacientes con glioblastoma multiforme. La mediana de seguimiento fue de 9 meses (rango intercuartílico: 5-17). Durante el tiempo de estudio se registraron 57 *exitus* y se censuraron 4 pacientes por pérdida del seguimiento. Con estos datos, la mediana de supervivencia para los pacientes con glioblastoma fue de 10 meses (95% IC: 7,5-12,5) y la tasa de supervivencia acumulada a los 2 años fue del 19% (95% IC: 7,6-30,4).

De las variables clínicas estudiadas, el tipo de cirugía y el tratamiento mostraron un efecto significativo sobre la supervivencia de los pacientes. Por otro lado, los pacientes con una edad por encima de la media (60 años), mostraron peor pronóstico que los menores de dicha edad ($p=0,035$; HR=1,8). No se encontraron diferencias significativas de supervivencia entre ambos sexos.

El tipo de cirugía constituye el parámetro clínico que mayor impacto ejerce sobre la supervivencia. Los pacientes en los que fue posible la resección completa del tumor mostraron una supervivencia mayor que aquellos con resección subtotal o parcial, con una mediana de supervivencia de 17 meses (95 % IC 8,3-25,7) frente a 6 meses (95 % IC 4,2-7,8) ($p < 0,001$; HR = 3,7) (Figura 5).

Para el análisis de la supervivencia, el tipo de tratamiento se dividió en dos categorías: la primera fusionando el grupo A con el B, de modo que se incluyen los pacientes sometidos a radio y quimioterapia; la segunda, resultante de la unión de los grupos C y D, incluye los pacientes que recibieron solo radioterapia después de la cirugía o recibieron algún tratamiento no estándar, respectivamente. La supervivencia de los pacientes sometidos a radio y quimioterapia fue significativamente superior a la de los que no recibieron quimioterapia ($p < 0,001$; HR = 2,7), con una mediana de supervivencia de 17 meses (95 % IC 9,2-24,8) frente a 6 meses (95 % IC 3,0-9,0).

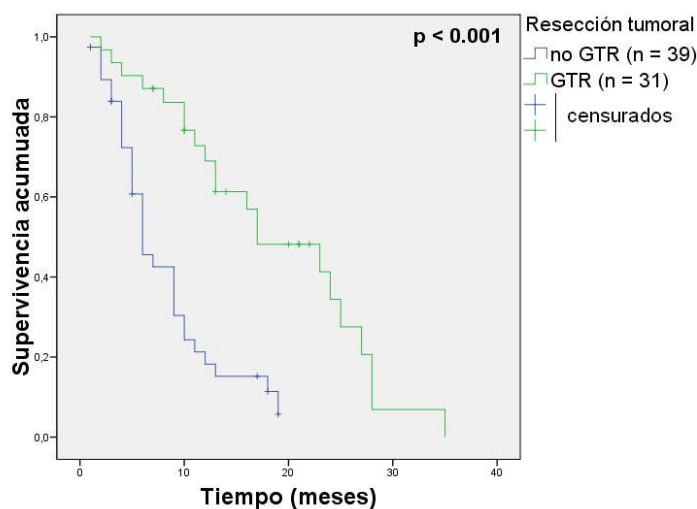


Figura 5. Curvas de supervivencia correspondientes a los pacientes con glioblastoma en función del tipo de resección tumoral. GTR: resección total. No GTR: resección subtotal o parcial.

De las variables moleculares analizadas en el grupo de pacientes con glioblastoma (grado IV), sólo la amplificación de *EGFR* mostró ser factor pronóstico ($p = 0,008$; HR = 2,7), con una mediana de supervivencia de 9 meses (95 % IC 7,0-11,0), frente a 23 meses (95 % IC 17,2-28,8) en el grupo que no presentaba amplificación del gen (Figura 6A). Teniendo en cuenta los diferentes grados de amplificación de *EGFR* (en función de su ratio de MLPA), la amplificación leve o moderada de *EGFR* mostró impacto negativo sobre la supervivencia, en comparación con la ausencia de amplificación ($p = 0,034$ y $p = 0,008$, respectivamente). Sin embargo, un nivel de amplificación elevado no confiere diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia de los pacientes que la presentan, respecto a los pacientes sin amplificación de este gen ni con valores de amplificación leves o moderados (Figura 6B).

Los pacientes con glioblastoma multiforme cuyos tumores presentaban pérdida de *PTEN* mostraron una tendencia estadística a mayor supervivencia ($p = 0,056$; HR = 1,9), con una mediana de 12 meses (95 % IC 8,9-15,1) frente a 6 meses (95 % IC 2,9-9,1). No obstante, la combinación de las pérdidas de *CDKN2A* y *PTEN* resultó ser de buen pronóstico ($p = 0,023$; HR = 1,9), con una mediana de supervivencia de 17 meses (95 % IC 7,2-26,8) para el grupo de pacientes que presenta ambas pérdidas, frente a 9 meses (95 % IC 5,1-12,9) en los que conservan estos genes.

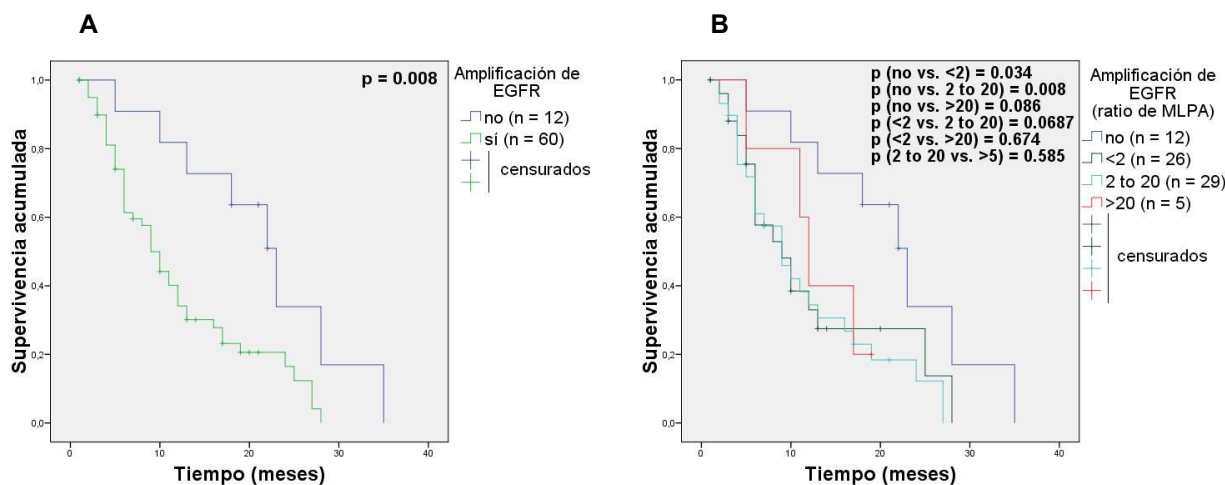


Figura 6. Curvas de supervivencia correspondientes a los pacientes con glioblastoma. **A:** estratificación en función de la amplificación de *EGFR*. **B:** estratificación en función del grado de amplificación de *EGFR*.

La metilación en el promotor de *MGMT* no mostró ningún efecto sobre la supervivencia de los pacientes con glioblastoma. Sin embargo, en el grupo de pacientes que no recibieron quimioterapia (grupos de tratamiento C y D) la presencia de metilación en el promotor de este gen resulta favorable ($p = 0,015$; HR = 2,7), mientras que en pacientes incluidos en los grupos de tratamiento A y B esta alteración no supuso beneficio (figura 7A y 7B). Asimismo, en el grupo de pacientes con metilación de *MGMT* no se encontraron diferencias de supervivencia en los pacientes tratados con quimioterapia frente a los que no (A+B vs. C+D); no obstante, en el grupo de pacientes sin esta alteración, el tratamiento que incluye quimioterapia además de la radioterapia mostró conferir mayor beneficio ($p = 0,001$; HR = 3,97) (figura 7C y 7D).

Por otro lado, en el subgrupo de pacientes que no pudieron ser sometidos a resección total, la metilación del promotor de *MGMT* resultó ser factor predictor de buen pronóstico ($p = 0,006$; HR = 2,0), con una supervivencia mediana de 9 meses (95 % IC 5,3-12,7) frente a 5 meses (95 % IC 3,7-6,3) en los pacientes cuyos tumores no presentaban metilación (figura 8).

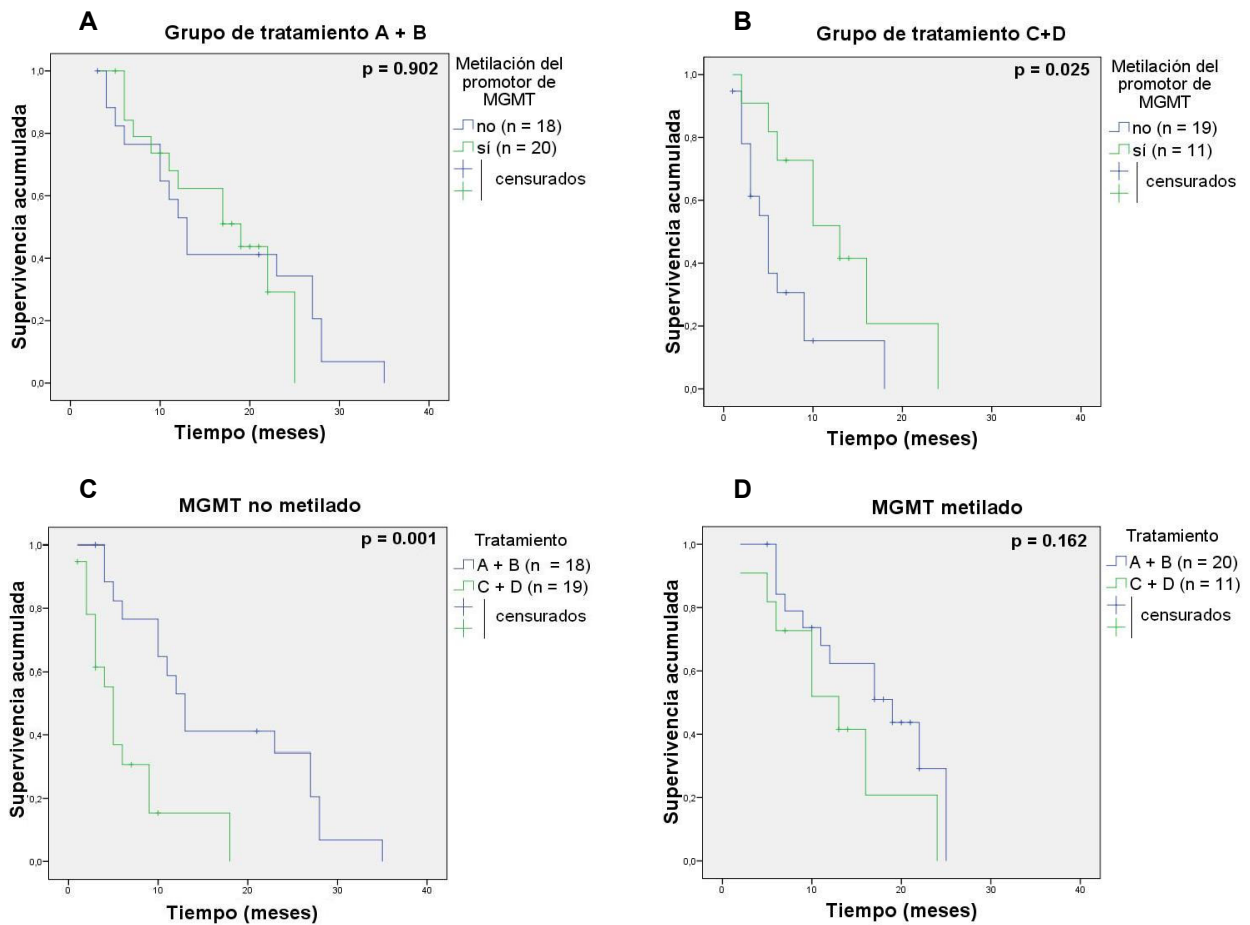


Figura 7. Curvas de supervivencia correspondientes a los pacientes con glioblastoma. **A:** estratificación en función de la presencia de metilación en el promotor de *MGMT* en el grupo de tratamiento A + B. **B:** estratificación en función de la presencia de metilación en el promotor de *MGMT* en el grupo de tratamiento C + D. **C:** estratificación en función del grupo de tratamiento en tumores sin metilación del promotor de *MGMT*. **D:** estratificación en función del grupo de tratamiento en tumores con metilación del promotor de *MGMT*.

Dado que los pacientes por encima de la media de edad (60 años) tienen peor pronóstico que los que están por debajo de ella ($p = 0,035$; HR = 1,8), se llevó a cabo el estudio de la supervivencia estratificando el grupo de pacientes con glioblastoma en función de la edad (para las variables en las que el número de casos lo permitía) con el fin de comprobar si las variables estudiadas tienen el mismo efecto en ambos subgrupos. De este estudio, cabe destacar que el efecto del tratamiento en la supervivencia se pierde en mayores de 60 años.

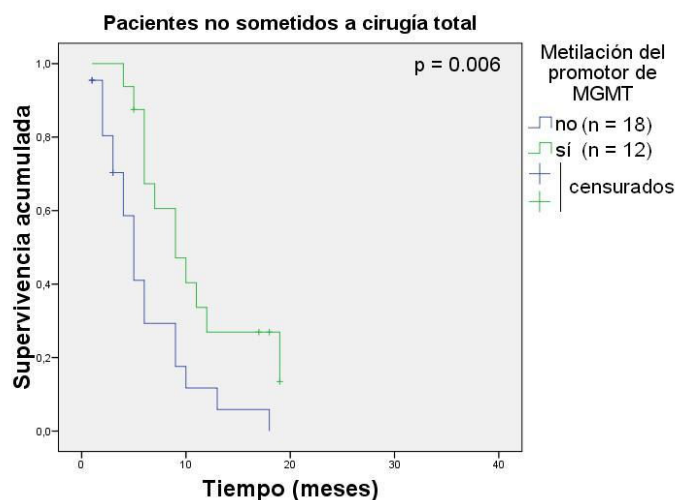


Figura 8. Curvas de supervivencia correspondientes a los pacientes con glioblastoma, estratificación en función del estado de metilación de MGMT en pacientes sometidos a resección parcial o subtotal.

En el análisis multivariante (regresión de Cox múltiple) se incluyeron las variables clínicas y moleculares que mostraron influencia sobre la supervivencia de los pacientes con glioblastoma multiforme en el estudio univariante: edad al diagnóstico, tipo de cirugía, tratamiento (A+B vs. C+D), amplificación de *EGFR* y pérdida conjunta de *CDKN2A* y *PTEN*. A excepción de la edad, todas las variables incluidas en el análisis mostraron valor pronóstico independiente. Los valores de p y la razón de riesgo (HR) de cada una de ellas se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Análisis COX multivariante en glioblastomas.

	COX multivariante			
	p	HR	95 % CI for HR	
Edad (<60 vs. >60 años)	0,737	-	-	-
Tratamiento (C+D vs. A+B)	0,006	2,77	1,34	5,73
Amplificación <i>EGFR</i>	0,002	5,27	1,86	14,98
Resección tumoral (parcial vs. total)	0,001	3,77	1,78	8,01
Pérdida conjunta de <i>CDKN2A</i> y <i>PTEN</i>	0,024	0,44	0,21	0,898

Significación estadística $p < 0,05$

4.3.2 Análisis de supervivencia: tumores de grado III

En relación a los pacientes con tumores de grado III, pudimos obtener información relativa a la supervivencia en 45 casos. La mediana de seguimiento fue de 9 meses (rango intercuartílico: 5-19). Durante el tiempo de estudio se registraron 18 *exitus* y se censuraron 6 pacientes por pérdida del seguimiento. La mediana de supervivencia de esta población de pacientes con tumores de grado III fue de 19 meses (95% IC: 13,8-24,2) La tasa de supervivencia acumulada al año fue del 71,3 % (95% IC: 54,8-87,8) y del 35,3 % (95% IC: 14,5-56,1) a los 2 años.

A diferencia de lo observado en los pacientes con glioblastoma, de las variables clínicas estudiadas, sólo la edad al diagnóstico mostró impacto sobre la supervivencia, de modo que los pacientes con edades por encima de la media de esta serie (53 años) tuvieron peor pronóstico ($p = 0,001$; HR = 5) (Figura 9). Sin embargo, no se encontraron diferencias de supervivencia entre los dos grupos de cirugía ni entre oligodendrogliomas y astrocitomas. La mayor parte de los pacientes analizados (80 %) recibieron radioterapia y quimioterapia, sin quimioterapia adyuvante (grupo B) como tratamiento post-quirúrgico.

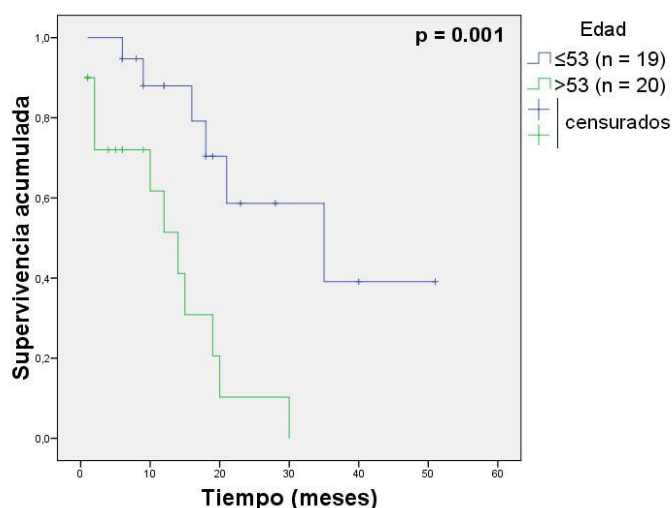


Figura 9. Curvas de supervivencia correspondientes a los pacientes con tumores de grado III, estratificación en función de la edad.

De las variables moleculares analizadas, las que resultaron significativas en el análisis de supervivencia fueron: la presencia de mutación en *IDHI*, la metilación del promotor de *MGMT* y las pérdidas de *PTEN* y de *CDKN2A*. Al contrario de lo que ocurre en glioblastomas, la amplificación de *EGFR* no mostró influencia sobre la supervivencia.

Como se puede observar en la Figura 10A, la alteración molecular con mayor influencia sobre la supervivencia en los tumores de grado III es la mutación en *IDHI*. Los pacientes cuyos tumores tienen mutación en este gen presentaron un pronóstico favorable ($p = 0,003$; HR = 5,52), con una mediana de supervivencia de 35 meses frente a 15 meses (95% IC: 11,1-18,9).

En contraste con los datos obtenidos en los pacientes con glioblastoma, la metilación del promotor de *MGMT* resultó ser factor de mejor pronóstico en el grupo de pacientes con gliomas de grado III ($p = 0,015$; HR = 3,4), con una mediana de supervivencia de 30 meses (95% CI: 12,1-47,9) frente a 14 meses (95% CI: 8,2-19,8) (Figura 10B). Por otro lado, tanto la pérdida de *PTEN* como de *CDKN2A* constituyen un factor de peor pronóstico ($p = 0,006$; HR = 4,3 y $p = 0,017$; HR = 4,2, respectivamente) (Figura 10C y 10D).

El efecto sobre la supervivencia de la co-delección 1p y 19q no alcanzó significación estadística ($p=0,064$; HR=33), probablemente debido a la baja incidencia de esta alteración. Sin embargo, cabe destacar que, al cierre de este estudio, todos los pacientes con tumores de grado III portadores de la codelección estaban vivos (Figura 1 anexo).

Finalmente, al igual que en el grupo de pacientes con glioblastomas, se llevó a cabo un estudio de la supervivencia, estratificando la población en función de la edad para las variables en las que el número de casos lo permitía. En el grupo de pacientes mayores de 53 años, la presencia de *EGFRvIII* resultó ser de buen pronóstico ($p = 0,034$; HR = 4,6).

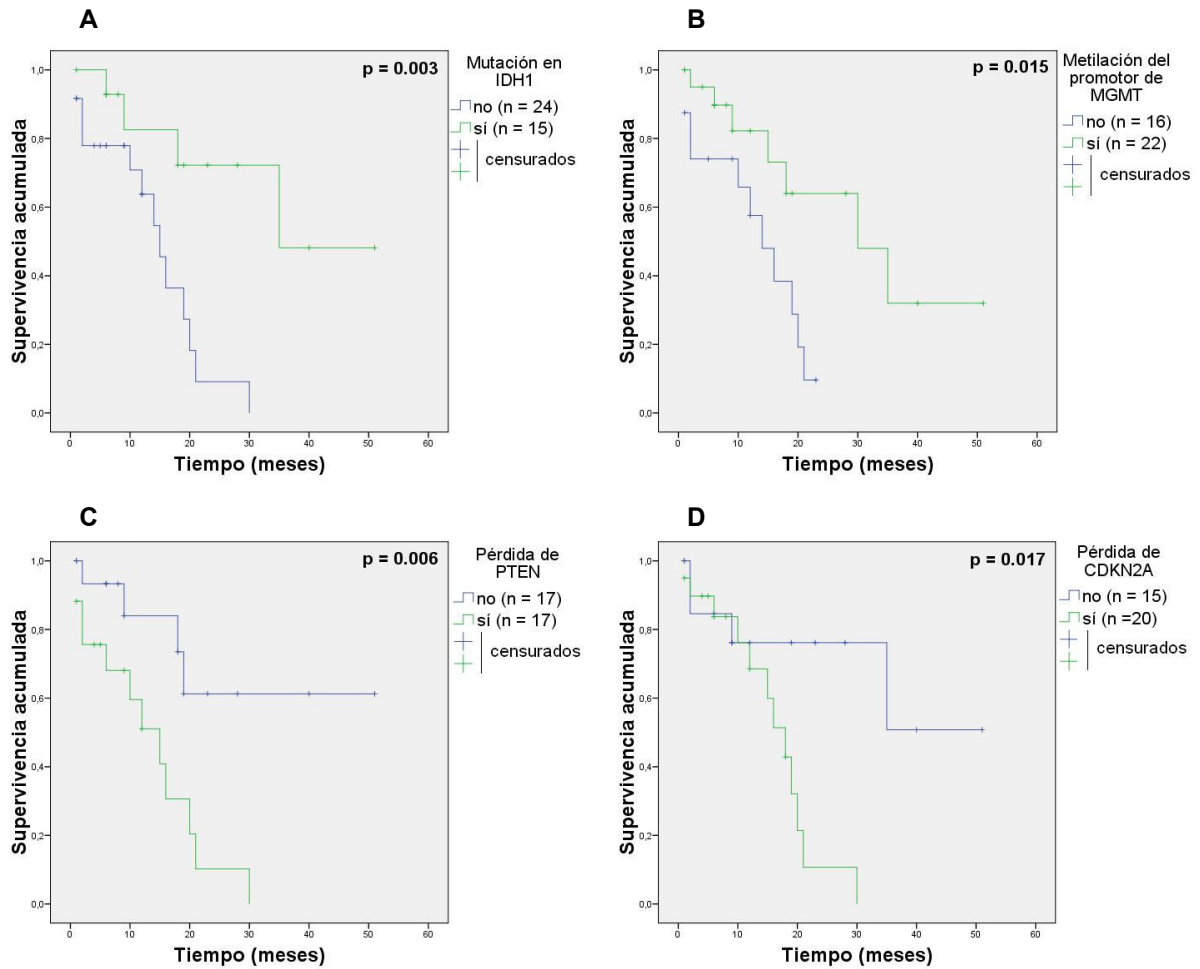


Figura 10. Curvas de supervivencia correspondientes a los pacientes con tumores de grado III. **A:** estratificación en función de la presencia de mutación en *IDH1*. **B:** estratificación en función de la metilación del promotor de *MGMT*. **C:** estratificación en función de la pérdida de *PTEN*. **D:** estratificación en función de la pérdida de *CDKN2A*.

En cuanto al análisis estadístico multivariante (regresión de Cox múltiple), incluimos las variables clínicas y moleculares que mostraron impacto sobre la supervivencia en el estudio univariante: edad al diagnóstico (categorizada en función de la media), mutación en *IDH1*, pérdida de *CDKN2A*, pérdida de *PTEN* y metilación del promotor de *MGMT*. Sólo la edad al diagnóstico resultó ser factor pronóstico de forma independiente ($p = 0,003$; HR = 5).

4.4 Análisis de expresión de microRNAs en gliomas

De forma paralela al estudio de las alteraciones moleculares descritas anteriormente, tal como hemos planteado en la introducción, nos propusimos estudiar si podíamos obtener una clasificación de los gliomas de acuerdo a una expresión diferencial de microRNAs, que pudiera darnos nueva información, bien de apoyo diagnóstico, por permitir la diferenciación entre tipos histológicos, o bien de valor pronóstico.

Para ello, procedimos a estudiar un grupo significativo de muestras tumorales, que inicialmente fueron 22 GBMs, 11 ODGs, 6 ASTs y 7 muestras de cerebro normal. Analizamos la expresión de 364 microRNAs en estas 46 muestras mediante PCR cuantitativa a tiempo real con el sistema Multiplex RT for TaqMan® Array Human MicroRNA Panel v1.0 (Applied Biosystems).

De todos los microRNAs analizados, 320 mostraron expresión en al menos una de las muestras, mientras que 44 microRNAs no se detectaron en ninguna de ellas. En general, se observó un descenso de la expresión global de microRNAs en las muestras tumorales respecto a las normales, aunque un pequeño número de éstos presentó altos niveles de expresión en tejido tumoral.

Para analizar los diferentes niveles de heterogeneidad de los datos de expresión obtenidos, realizamos un análisis de componentes principales (PCA). Se trata de una técnica descriptiva multidimensional no supervisada, basada en la correlación de las variables analizadas. En este tipo de análisis se reduce la dimensionalidad del conjunto de datos, de forma que se construye una transformación lineal, con un sistema de coordenadas para el conjunto original de datos, en el que la varianza de mayor tamaño es capturada en el primer eje, la segunda varianza más grande es el segundo eje y así sucesivamente. De este modo, las nuevas variables son combinaciones lineales de las anteriores y no muestran correlación entre sí, sino que se ordenan en función de la variabilidad total que recogen de la muestra.

Para nuestro estudio de expresión de microRNAs, este tipo de análisis no supervisado mostró una clara separación en dos grupos, que se corresponden, tras su posterior identificación, con las muestras de cerebro normal y tumoral (Figura 11), por lo que concluimos que el perfil de expresión de microRNAs parece así constituir un elemento válido e independiente para la clasificación de nuestras muestras.

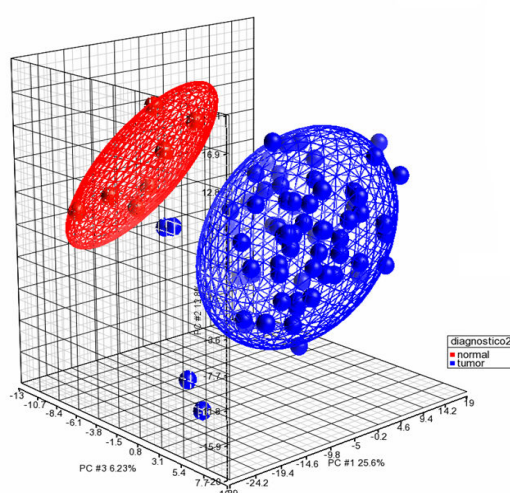


Figura 11. Análisis no supervisado de componentes principales de la expresión de 364 microRNAs en muestras de tejido cerebral normal y tumoral.

Para comprobar que la capacidad clasificatoria del análisis de microRNAs mediante el uso de arrays de baja densidad de PCR cuantitativa a tiempo real no se circunscribía únicamente a la presencia de dos condiciones en un único tipo de tejido, analizamos adicionalmente 23 muestras de RNA obtenido de tejido mamario tumoral y 3 de tejido mamario normal y llevamos a cabo un análisis de correlación global, incluyendo también las muestras de glioma y de cerebro normal. Los resultados (Figura 12), mostraron que el perfil de expresión de microRNAs es capaz de diferenciar claramente tejido de mama y cerebro normal entre sí y de sus correspondientes tumores.

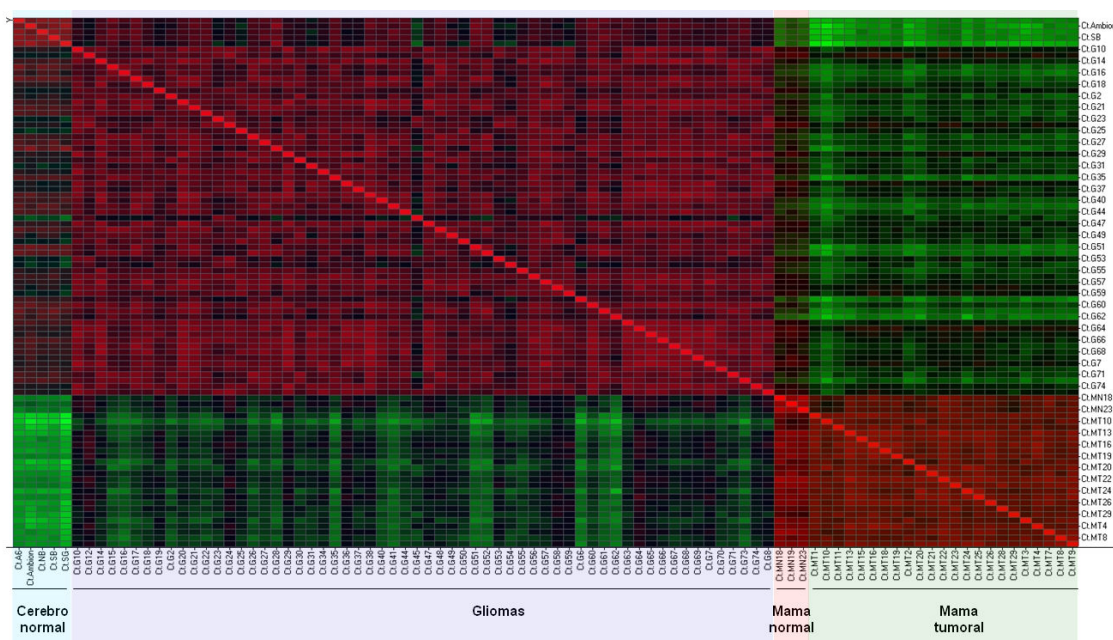


Figura 12. Análisis de correlación global de la expresión de microRNAs en tejido de mama y cerebro normal y tumoral.

4.4.1 Análisis estadístico de la expresión diferencial de microRNAs entre tumores gliales y tejido cerebral normal

Una vez comprobado que la expresión de los microRNAs analizados discierne entre varios tejidos normales y tumorales, llevamos a cabo, sobre las muestras de tejido cerebral normal y tumoral, un análisis estadístico comparativo de las medias de expresión de los microRNAs, para determinar cuáles mostraban expresión diferencial y en qué medida.

De los 320 microRNAs en los que se detectó amplificación, 180 mostraron diferencias significativas de expresión (valor de p ajustado $< 0,05$) entre controles y tumores (Tabla 3 anexo). En todos los casos hemos utilizado valores de p ajustados, condición requerida en análisis múltiples con gran cantidad de datos; para ello utilizamos el método de corrección de datos múltiples (FDR) de Benjamini-Hochberg. Algunos de estos microRNAs presentaron niveles de sobre-expresión o represión muy elevados en tumores respecto al tejido cerebral normal, en un rango de magnitud (*fold change*) que oscila desde un aumento en 281 veces hasta un descenso de 74, respecto de los valores de expresión en tejido normal. De estos 180 microRNAs con expresión diferencial estadísticamente significativa entre tejido cerebral normal y tumoral, se muestran en orden decreciente, los 30 más significativos en la Tabla 4.

Tabla 4. Relación de los 30 microRNAs con expresión diferencial entre controles y tumores con menor p ajustado, ordenados en valores crecientes de p .

Tumor frente a cerebro normal			Tumor frente a cerebro normal		
microRNA	valor p	Magnitud	microRNA	valor p	Magnitud
hsa-miR-330	7,28E-14	-25,9	hsa-miR-151	2,08E-09	-4,1
hsa-miR-331	3,11E-13	-3,7	hsa-miR-29c	2,38E-09	-6,4
hsa-miR-103	2,23E-12	-3,8	hsa-miR-98	5,51E-09	-4,2
hsa-miR-342	6,79E-12	-4,6	hsa-miR-23b	9,59E-09	-8,2
hsa-miR-340	4,14E-11	-7,9	hsa-miR-181c	1,46E-08	-4,3
hsa-let-7g	8,14E-11	-3,2	hsa-miR-139	2,10E-08	-38,4
hsa-miR-338	1,33E-10	-44,5	hsa-miR-594	3,01E-08	8,1
hsa-miR-10b	1,71E-10	280,9	hsa-miR-433	3,45E-08	-16,8
hsa-miR-140	2,65E-10	-3,7	hsa-miR-324-5p	3,87E-08	-4,1
hsa-miR-425	3,00E-10	-4,9	hsa-miR-213	4,16E-08	-4,7
hsa-miR-181b	5,68E-10	-5,0	hsa-miR-218	1,27E-07	-19,2
hsa-miR-196b	1,34E-09	124,4	hsa-miR-197	1,56E-07	-3,1
hsa-let-7d	1,41E-09	-3,9	hsa-miR-27b	1,90E-07	-6,7
hsa-miR-190	1,46E-09	-8,9	hsa-miR-181d	1,95E-07	-3,0
hsa-miR-328	1,54E-09	-5,2	hsa-miR-196a	2,66E-07	206,6

Significación estadística $p < 0,05$

Para poder definir el número mínimo de microRNAs capaces de discernir entre muestras tumorales y tejido sano utilizamos el programa Prophet (Medina y col., 2007), incluido en el paquete de herramientas GEPAS. Este programa se basa en un esquema supervisado de validación cruzada. En primer lugar, preselecciona los datos de expresión que más precisión aporten al modelo, utilizando el ratio F o el estadístico de Wilcoxon (aproximación de filtro) y ordena los datos en función de ese valor; a continuación va analizando la matriz de confusión generada a partir de todas las combinaciones posibles eliminando un dato cada vez. De todos los clasificadores resultantes se selecciona el que tenga la menor tasa de error con el menor número de datos de expresión (analiza por defecto grupos de 5, 10, 35, 50, 75 y 100 datos). El análisis de nuestros datos de expresión de microRNAs mediante este procedimiento mostró que los valores de expresión de 35 microRNAs son suficientes para separar, sin lugar a error en la tabla de confusión generada, las muestras tumorales de las normales (Tabla 4 anexo). La mayoría de estos microRNAs coinciden con los que mostraron valores de p más bajos en el estudio comparativo de las medias de expresión entre controles y tumores, en vez de con los que mostraron mayor magnitud en el cambio de expresión. Por esta razón y dado que la

magnitud del cambio puede estar muy influenciada por datos extremos, no se ha utilizado el valor de magnitud como primera opción para evaluar la importancia de las diferencias obtenidas mediante análisis estadístico, sino el valor de p ajustado.

4.5 Clasificación de los gliomas en función de los datos de expresión de microRNAs

Uno de los primeros objetivos planteados en relación al estudio de expresión de microRNAs en gliomas era determinar si se pueden distinguir los distintos tipos histológicos, oligodendrogliomas, astrocitomas y glioblastomas multiformes, mediante la utilización de los perfiles de expresión. El conjunto inicial de muestras sobre las que realizamos este estudio consta de 22 glioblastomas, 6 astrocitomas y 11 oligodendrogliomas. Para evaluar si era posible la predicción de estos tipos tumorales mediante el patrón de expresión de microRNAs, utilizamos nuevamente el programa Prophet, de la misma forma que para la clasificación de tejido normal y tumoral. Sin embargo, esta aproximación estadística supervisada no logró en este caso una segregación adecuada de estos grupos. Tampoco fue posible obtener ningún agrupamiento de los tipos histológicos realizando análisis jerárquicos no supervisados a partir de los patrones de expresión de microRNAs y ya en el análisis de componentes principales (PCA) no se observó ninguna asociación de las muestras de acuerdo con sus etiquetas histopatológicas (Figura 2 en anexo).

En vista de estos resultados, con el fin de determinar si existen patrones de expresión de microRNAs comunes entre muestras tumorales que puedan formar parte de otros grupos, más allá de los tipos tumorales establecidos por la OMS, aplicamos otro tipo de aproximación estadística, en este caso el “algoritmo de agrupamiento de las k-medias” (Quackenbush, 2001) mediante el programa estadístico Partek® Genomics Suite™ (Partek Inc., St. Louis, MO). Este método mostró la presencia de 3 grupos diferenciados de forma significativa por su patrón de expresión de microRNAs. A estos grupos los denominamos 1, 2 y 3. Con el fin de visualizar los resultados obtenidos por este algoritmo, realizamos la adjudicación de los nuevos grupos determinados únicamente por la expresión de microRNAs sobre un análisis de componentes principales, pudiendo observar que los tres grupos, aunque presentan un pequeño grado de solapamiento, tienen suficiente consistencia (Figura 13).

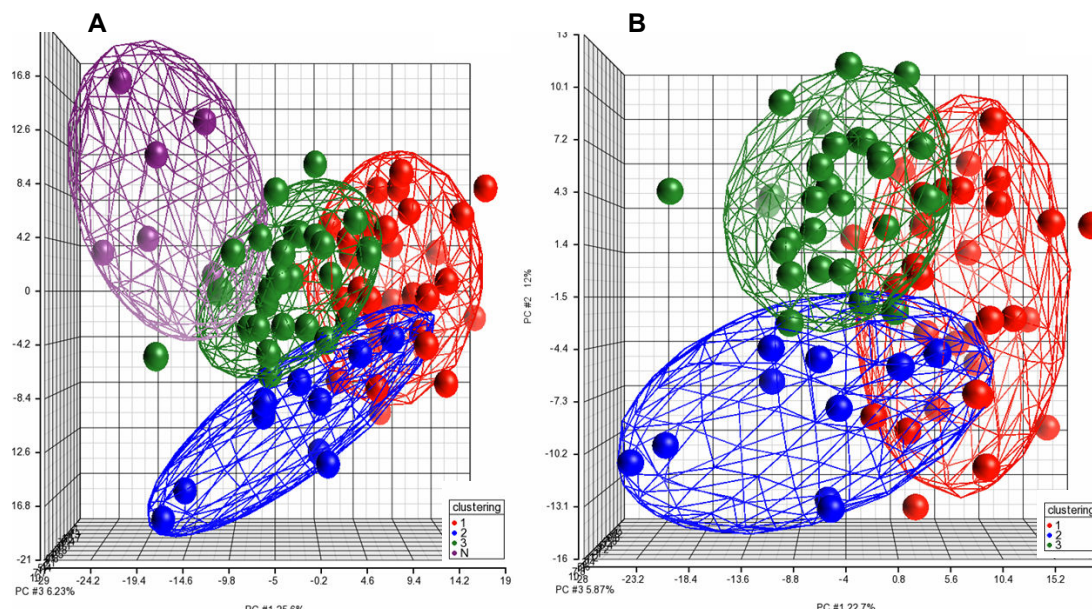


Figura 13. Análisis de componentes principales. **A:** muestras tumorales y de tejido cerebral normal; identificación posterior de tejido normal (morado) y nuevos grupos tumorales (1 en rojo, 2 en azul y 3 en verde). **B:** muestras tumorales; identificación posterior de los nuevos grupos tumorales.

4.5.1 Caracterización biológica de los nuevos grupos de gliomas definidos por expresión diferencial de microRNAs

Con el fin de obtener información que nos permitiera adjudicar alguna característica específica a cada uno de los grupos de gliomas obtenidos mediante el “algoritmo de agrupamiento de las k-medias”, llevamos a cabo varias comparaciones entre los microRNAs expresados diferencialmente. En primer lugar se realizó una comparación entre los microRNAs expresados diferencialmente en cada uno de los nuevos grupos tumorales respecto al tejido cerebral normal. Los resultados más significativos se muestran en la Tabla 5. Parte de los microRNAs que aparecen son comunes entre los grupos tumorales, pero otros son específicos de cada grupo. Se puede observar que todos los microRNAs expresados diferencialmente y que son específicos del grupo 1 se encuentran reprimidos moderadamente, entre 2,9 y 32,4 veces, respecto a tejido cerebral normal. Sin embargo, algunos de los microRNAs específicos del grupo 2 se encuentran reprimidos en un grado de magnitud muy alto, llegando a alcanzar hasta 1898 veces frente a tejido normal. Por el contrario, algunos de los microRNAs expresados diferencialmente frente a tejido normal y que son específicos del grupo 3 presentan una sobre-expresión importante, de una magnitud de hasta 546,5 veces.

Tabla 5. Expresión diferencial de microRNAs en cada uno de los nuevos grupos tumorales (1, 2, y 3) respecto al tejido cerebral normal.

Grupo 1 frente a cerebro normal			Grupo 1 frente a cerebro normal		
microRNA	p	Magnitud	microRNA	p	Magnitud
hsa-let-7g	1,54E-15	-4,0	hsa-miR-324-5p	1,98E-10	-5,1
hsa-miR-103	7,95E-15	-4,4	hsa-miR-181b	2,91E-10	-5,0
hsa-miR-330	2,57E-14	-28,7	hsa-miR-151	3,08E-10	-4,7
hsa-miR-331	4,14E-14	-4,0	hsa-miR-518c	3,37E-10	-4,3
hsa-let-7d	8,93E-14	-4,9	hsa-miR-98	4,24E-10	-4,8
hsa-miR-342	1,35E-13	-5,3	hsa-miR-27b	5,18E-10	-8,7
hsa-miR-425	1,75E-13	-6,6	hsa-miR-181c	1,46E-09	-4,4
hsa-miR-425-5p	4,24E-13	-4,4	hsa-miR-1	1,51E-09	-32,4
hsa-miR-29c	1,78E-12	-8,9	hsa-miR-544	2,39E-09	-5,3
hsa-miR-140	1,87E-12	-4,2	hsa-miR-133a	2,71E-09	-19,6
hsa-miR-23b	2,56E-11	-10,7	hsa-miR-365	2,80E-09	-4,8
hsa-miR-191	3,14E-11	-2,9	hsa-miR-433	2,93E-09	-19,7
hsa-miR-340	5,09E-11	-7,8	hsa-miR-148b	3,49E-09	-3,6
hsa-miR-338	7,04E-11	-41,7	hsa-miR-29a	5,46E-09	-4,2
hsa-miR-190	7,73E-11	-10,2	hsa-miR-10b	5,72E-09	169,5

Grupo 2 frente a cerebro normal			Grupo 2 frente a cerebro normal		
microRNA	p	Magnitud	microRNA	p	Magnitud
hsa-miR-124a	2,49E-14	-1897,8	hsa-miR-23b	1,21E-10	-14,4
hsa-miR-330	4,37E-14	-49,5	hsa-miR-433	1,55E-10	-47,7
hsa-miR-338	1,89E-13	-177,9	hsa-miR-27b	2,81E-10	-13,4
hsa-miR-103	1,07E-12	-4,7	hsa-miR-30e-5p	5,58E-10	-8,3
hsa-miR-139	1,19E-12	-238,7	hsa-miR-219	5,63E-10	-1122,5
hsa-miR-340	1,45E-12	-14,6	hsa-miR-95	1,06E-09	-20,4
hsa-miR-181c	2,11E-12	-8,4	hsa-miR-328	1,99E-09	-7,4
hsa-miR-331	2,12E-12	-4,4	hsa-let-7a	2,79E-09	-3,9
hsa-miR-181b	2,22E-12	-8,9	hsa-miR-98	3,64E-09	-5,5
hsa-miR-140	4,68E-12	-5,2	hsa-miR-129	4,32E-09	-572,2
hsa-let-7d	8,47E-12	-5,3	hsa-miR-132	5,83E-09	-13,9
hsa-miR-181d	9,38E-12	-5,5	hsa-miR-383	7,37E-09	-761,4
hsa-miR-342	1,11E-11	-5,7	hsa-miR-29c	8,64E-09	-7,2
hsa-miR-190	1,44E-11	-17,6	hsa-miR-324-5p	9,73E-09	-5,4
hsa-let-7g	3,03E-11	-3,5	hsa-miR-410	1,19E-08	-46,3

Grupo 3 frente a cerebro normal			Grupo 3 frente a cerebro normal		
microRNA	p	Magnitud	microRNA	p	Magnitud
hsa-miR-330	6,37E-12	-18,6	hsa-miR-140	2,87E-08	-2,9
hsa-miR-10b	8,34E-12	576,4	hsa-miR-139	4,48E-08	-28,1
hsa-miR-331	5,05E-11	-3,1	hsa-miR-190	1,03E-07	-6,1
hsa-miR-103	3,21E-10	-3,1	hsa-let-7d	1,53E-07	-2,8
hsa-miR-196b	5,95E-10	190,5	hsa-miR-151	2,03E-07	-3,4
hsa-miR-340	1,02E-09	-6,6	hsa-miR-181c	3,01E-07	-3,4
hsa-miR-342	1,09E-09	-3,6	hsa-miR-29c	3,11E-07	-4,3
hsa-miR-338	1,74E-09	-29,5	hsa-miR-98	5,95E-07	-3,3
hsa-let-7g	6,77E-09	-2,5	hsa-miR-213	6,92E-07	-4,4
hsa-miR-10a	7,28E-09	546,5	hsa-miR-23b	1,18E-06	-5,0
hsa-miR-594	8,08E-09	9,8	hsa-miR-181d	1,79E-06	-2,5
hsa-miR-328	1,00E-08	-5,0	hsa-miR-433	1,88E-06	-10,0
hsa-miR-196a	1,12E-08	497,1	hsa-miR-182	2,30E-06	17,6
hsa-miR-181b	1,22E-08	-4,2	hsa-miR-183	2,63E-06	25,2
hsa-miR-425	2,26E-08	-3,7	hsa-miR-324-5p	5,23E-06	-3,0

Se muestran los 30 primeros microRNAs diferencialmente expresados con menor valor de *p* ajustado, ordenados en valores crecientes de *p*. Se muestran sombreados los microRNAs expresados diferencialmente frente a tejido cerebral normal que son específicos para cada grupo. Significación estadística $p < 0,05$

Además de comparar cada uno de los grupos tumorales determinados por el patrón de expresión de microRNAs frente a tejido cerebral normal, realizamos un análisis de expresión diferencial de cada grupo respecto a los otros dos. Los resultados más significativos se muestran en la Tabla 5 del anexo y en la Tabla 6. El grupo 1 se caracteriza principalmente por una expresión reducida de miR-21 y elevada de miR-9, mientras que en el grupo 2 la característica más destacable es la represión de miR-9, miR-124a, miR-129, miR-383 y miR-219 entre otros. El grupo 3, por su parte, presenta una marcada sobre-expresión de miR-1 y de miR-124a.

Con el objetivo de intentar definir alguna característica biológica que estuviera marcada por el conjunto de microRNAs expresados diferencialmente de forma significativa en cada grupo, y dada la complejidad de analizar el posible papel de cada microRNA de forma individual, probamos diversas aproximaciones bioinformáticas. Una de ellas fue la utilización del programa TAM: *Tool for annotations of microRNAs*, (Lu y col., 2010), que analiza el enriquecimiento de una lista dada de microRNAs en determinadas funciones o vías biológicas sobre las que se ha demostrado su implicación.

El análisis de los microRNAs diferencialmente expresados entre muestras de cerebro normal y tumores mostró un enriquecimiento significativo ($p < 0,05$) en “microRNAs supresores de tumores”. Así, el 70% de todos los microRNAs con dicha función presentan expresión diferencial entre tejido normal y tumoral (Figura 14A). Los datos de expresión comparada nos permiten conocer además que todos ellos están reprimidos en los tumores (Tabla 3 anexo). En el análisis de la expresión diferencial de cada uno de los grupos frente al tejido normal, las listas de microRNAs expresados diferencialmente mostraron también enriquecimiento en “genes supresores de tumores” (81%, 73% y 60% respectivamente) como una de las etiquetas más significativas (Figura 3 en anexo). En los grupos 1 y 2 todos los microRNAs etiquetados como “supresores de tumores” muestran represión, sin embargo, en el grupo 3, los microRNAs miR-141 y miR-451, específicamente relacionados con represión tumoral por el programa TAM, muestran sobre-expresión. Los grupos 2 y 3 están también enriquecidos en “microRNAs específicos de tejido cerebral” ($p < 0,05$) (Figura 4 en anexo).

Tabla 6. Expresión diferencial de microRNAs entre los nuevos grupos tumorales.

1 vs 2 y 3			1 vs 2 y 3		
MicroRNA	p	Magnitud	MicroRNA	p	Magnitud
hsa-miR-146b	1,29E-10	-4,5	hsa-miR-657	1,12E-08	-2,0
hsa-miR-21	4,26E-10	-6,5	hsa-miR-220	1,26E-08	-1,9
hsa-miR-515-5p	5,24E-10	-2,0	hsa-miR-325	1,27E-08	-1,9
hsa-miR-202	8,32E-10	-2,0	hsa-miR-661	1,45E-08	-2,0
hsa-miR-578	9,01E-10	-1,9	hsa-miR-214	1,71E-08	-4,2
hsa-miR-9	1,27E-09	3,3	hsa-miR-506	1,92E-08	-1,9
hsa-miR-515-3p	1,55E-09	-1,9	hsa-miR-425-5p	2,11E-08	-1,9
hsa-miR-544	2,23E-09	-2,3	hsa-miR-199a	4,47E-08	-4,1
hsa-miR-650	2,40E-09	-6,5	hsa-miR-142-5p	5,40E-08	-3,2
hsa-miR-155	3,15E-09	-5,2	hsa-miR-520b	6,23E-08	-1,9
hsa-miR-22	3,17E-09	-2,9	hsa-miR-518c	6,26E-08	-1,9
hsa-miR-302a	4,11E-09	-2,0	hsa-miR-142-3p	6,86E-08	-3,5
hsa-miR-523	7,22E-09	-2,0	hsa-miR-518c	8,80E-08	-1,9
hsa-miR-371	9,25E-09	-2,1	hsa-miR-210	1,06E-07	-4,7
hsa-miR-606	1,07E-08	-2,1	hsa-miR-658	1,19E-07	-2,0

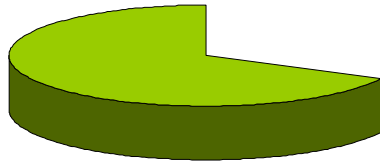
2 vs 1 y 3			2 vs 1 y 3		
MicroRNA	p	Magnitud	MicroRNA	p	Magnitud
hsa-miR-9	6,65E-13	-7,4	hsa-miR-515-3p	1,68E-05	1,8
hsa-miR-9	3,22E-10	-6,5	hsa-miR-650	1,98E-05	5,3
hsa-miR-124a	2,88E-09	-49,7	hsa-miR-219	2,21E-05	-24,2
hsa-miR-544	9,45E-08	2,7	hsa-miR-181c	2,49E-05	-2,2
hsa-miR-183	6,78E-07	-17,2	hsa-let-7a	4,22E-05	-1,8
hsa-miR-488	6,26E-06	-9,3	hsa-miR-220	4,27E-05	1,8
hsa-miR-578	7,75E-06	1,8	hsa-miR-30e-5p	6,87E-05	-2,4
hsa-miR-181d	8,18E-06	-2,0	hsa-miR-195	8,09E-05	-2,1
hsa-miR-125b	9,79E-06	-2,0	hsa-miR-146b	8,27E-05	3,0
hsa-miR-95	1,16E-05	-4,3	hsa-miR-325	8,71E-05	1,8
hsa-miR-383	1,23E-05	-31,8	hsa-miR-302a	9,02E-05	1,8
hsa-miR-139	1,48E-05	-8,4	hsa-miR-520b	9,81E-05	1,8
hsa-miR-515-5p	1,58E-05	1,8	hsa-miR-410	9,91E-05	-5,9
hsa-miR-202	1,62E-05	1,8	hsa-miR-155	0,0001084	3,7
hsa-miR-129	1,66E-05	-23,7	hsa-miR-512-5p	0,00013937	2,1

3 vs 1 y 2			3 vs 1 y 2		
MicroRNA	p	Magnitud	MicroRNA	p	Magnitud
hsa-miR-124a	1,92E-08	16,0	hsa-miR-299-5p	1,16E-05	3,8
hsa-miR-1	5,98E-08	6,9	hsa-miR-411	1,33E-05	4,7
hsa-let-7d	2,87E-07	1,8	hsa-miR-9	1,35E-05	2,2
hsa-let-7a	3,75E-07	1,8	hsa-miR-133a	1,50E-05	3,7
hsa-miR-345	4,06E-07	1,9	hsa-let-7f	1,68E-05	1,7
hsa-miR-125b	4,21E-07	1,9	hsa-let-7b	1,95E-05	1,7
hsa-miR-130a	1,19E-06	1,9	hsa-miR-30e-5p	2,11E-05	2,0
hsa-miR-27b	1,76E-06	2,7	hsa-miR-181c	2,75E-05	1,8
hsa-miR-132	2,11E-06	2,9	hsa-miR-9	3,67E-05	2,3
hsa-miR-25	2,27E-06	1,7	hsa-miR-99a	3,76E-05	1,8
hsa-let-7g	3,14E-06	1,5	hsa-miR-100	4,40E-05	1,6
hsa-miR-16	7,06E-06	1,7	hsa-miR-382	5,26E-05	3,3
hsa-miR-23b	7,13E-06	2,5	hsa-miR-656	5,68E-05	3,7
hsa-miR-410	7,89E-06	4,9	hsa-miR-103	5,87E-05	1,5
hsa-miR-140	1,04E-05	1,6	hsa-miR-148b	8,42E-05	1,6

Comparación de cada grupo frente a los otros dos. Relación de los 30 primeros microRNAs con expresión diferencial, con menor valor de *p* ajustado, ordenados en valores crecientes de *p*.

A

Tumor vs. Normal



Tumoral vs. Normal	
microRNAs supresores de tumores	
hsa-mir-101	hsa-mir-125b
hsa-mir-1	hsa-mir-127
hsa-mir-126	hsa-mir-143
hsa-mir-200a	hsa-mir-145
hsa-let-7a	hsa-mir-181b
hsa-let-7b	hsa-mir-181c
hsa-let-7d	hsa-mir-26a
hsa-let-7e	hsa-mir-26b
hsa-let-7f	hsa-mir-29a
hsa-let-7g	hsa-mir-29c
hsa-mir-124	hsa-mir-34b
hsa-mir-125a	hsa-mir-34c
hsa-mir-98	

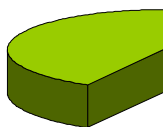
B

1 vs. 2 y 3
onco-microRNAs
hsa-mir-146b
hsa-mir-155
hsa-mir-191
hsa-mir-21
hsa-mir-210
hsa-mir-214
hsa-mir-221
hsa-mir-222
hsa-mir-223
hsa-mir-24
hsa-mir-372
hsa-mir-224
hsa-mir-27a

2 vs. 1 y 3
microRNAs específicos de cerebro
hsa-mir-383
hsa-mir-219
hsa-mir-124a
hsa-mir-9
hsa-mir-128b
hsa-mir-129
hsa-mir-323

3 vs. 1 y 2
microRNAs anti-proliferación celular
hsa-let-7a
hsa-let-7b
hsa-let-7c
hsa-let-7d
hsa-let-7f
hsa-mir-98
hsa-let-7g
hsa-mir-16

1 vs. 2 y 3



2 vs. 1 y 3



3 vs. 1 y 2

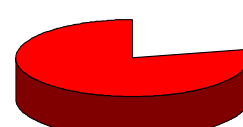


Figura 14. En la figura se representa el porcentaje de microRNAs de cada categoría respecto al total de microRNAs en ella etiquetados por el programa TAM; el color verde representa los microRNAs reprimidos y el rojo los sobre-expresados. En la tabla se muestran los microRNAs con expresión diferencial. **A:** MicroRNAs supresores de tumores diferencialmente expresados entre controles y tumores de cada uno de los grupos. **B:** MicroRNAs correspondientes a diversas categorías biológicas diferencialmente expresados entre los grupos.

El análisis mediante TAM de los grupos de microRNAs expresados diferencialmente en cada grupo tumoral respecto a los otros dos mostró un enriquecimiento en “onco-microRNAs” para el grupo 1 frente al resto, todos ellos con expresión reducida en dicho grupo, mientras que para los resultantes de la comparación del grupo 2 frente al resto mostró un enriquecimiento en “microRNAs específicos de tejido cerebral”, como miR-9, con bajos niveles de expresión en el grupo. En la lista resultante de microRNAs expresados diferencialmente entre el grupo 3 y el resto de grupos tumorales se encuentran gran número de “microRNAs anti-proliferación celular”, como algunos miembros de la familia let-7, que en este caso muestran sobre-expresión en el grupo individual objeto de análisis (Figura 14B).

En cuanto a las alteraciones moleculares estudiadas previamente asociadas a estos grupos, cabe destacar la alta frecuencia de amplificación de EGFR del grupo 1 y la ausencia total de mutantes de IDH1 en el grupo 2 (Figura 15).

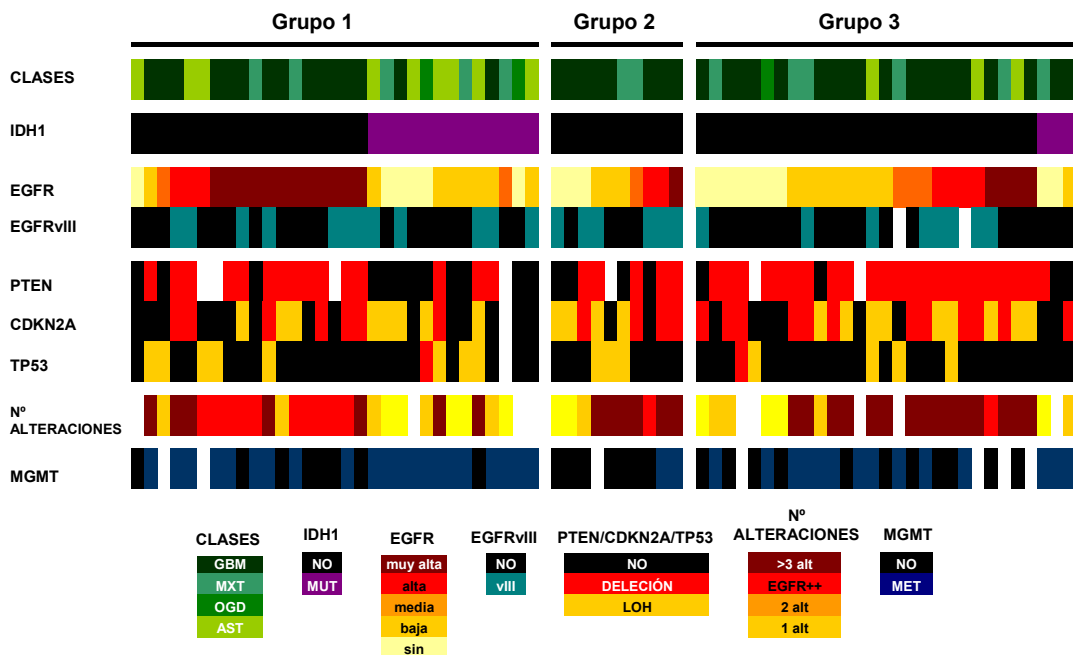


Figura 15. Distribución de frecuencias de las alteraciones moleculares analizadas en cada uno de los nuevos grupos. Se muestra de arriba abajo: clase histológica, mutación en IDH1, amplificación de EGFR, presencia de variante III de EGFR (EGFRvIII), pérdida de PTEN, CDKN2A y TP53, número de alteraciones de la muestra (EGFR++: la elevada amplificación de EGFR no permite determinar el resto de las alteraciones) y metilación del promotor de MGMT.

4.5.2 Definición de un algoritmo para la determinación de los nuevos grupos de gliomas

Dada la ventaja que supondría poder determinar el grupo al que corresponde una muestra con un análisis más sencillo que pudiera encajar dentro de la práctica de rutina de un laboratorio hospitalario, procedimos al diseño de un algoritmo de predicción de grupo. Para ello seleccionamos los microRNAs con la expresión más característica de cada grupo. Teniendo en cuenta la media de expresión del microRNA en cuestión en las muestras analizadas en cada grupo y su desviación estándar, se definieron unos intervalos de valor de ΔCt para esos microRNAs que podrían predecir a qué grupo pertenece una muestra desconocida. Adicionalmente, se tuvo en cuenta la mutación en *IDH1*, ya que su presencia excluiría a la muestra del grupo 2. Por tanto, utilizando los valores de estos microRNAs de forma secuencial y la variable molecular mutación en *IDH1*, se desarrolló un algoritmo de predicción. Para los casos con mutación en *IDH1* se utilizaron los valores de expresión de miR-21 y miR-9 de manera secuencial, es decir, si el valor de ΔCt de miR-21 es mayor o igual a 1, la muestra corresponde al grupo 1 y si es mayor de ese valor el grupo se asigna en función de la expresión de miR-9. De la misma forma, para los casos sin mutación en *IDH1*, se utilizan los valores de miR-1, miR-124a y miR-9 de forma secuencial (Tabla 7).

Con el fin de evaluar la validez del algoritmo analizamos 18 muestras independientes, catalogadas en su correspondiente grupo mediante el perfil de expresión de los 320 microRNAs. El algoritmo asignó el mismo grupo a todas las muestras, de modo que la correlación entre ambos métodos resultó óptima (índice Kappa = 1).

Tabla 7. Valores de expresión de microRNAs de referencia para el algoritmo de predicción de grupo.

Muestras sin mutación de IDH1			Muestras con mutación de IDH1		
microRNA	ΔCt	Grupo	microRNA	ΔCt	Grupo
miR-1	≥ 14	1	miR-21	≥ 1	1
miR-124a	≥ 7	1	miR-9	≤ -2	1
miR-9	≥ 0	2	miR-21	≤ 0	3
miR-1	entre 9 y 11	2	miR-9	≥ 2	3
miR-124a	≥ 9	2			
miR-9	≥ -2	2			
miR-1	≤ 9	3			
miR-124a	≤ 6	3			

Con el fin de aumentar el número de muestras de cada grupo y poder establecer si existe algún tipo de correlación entre estos grupos y las variables clínico-patológicas y moleculares estudiadas, se asignó grupo, mediante expresión de los 320 microRNAs expresados en tejido, a 28 muestras más y se utilizó el algoritmo basado en la expresión de 4 microRNAs y en la presencia de mutación en *IDHI* para la asignación de grupo en 47 muestras adicionales. El número total de muestras utilizadas de cada tipo tumoral se detalla en la Tabla 8.

Tabla 8. Características clínico-patológicas de los pacientes estudiados y sus tumores (n = 114) en función de los grupos de expresión de microRNAs (1,2 y 3) definidos en este trabajo.

	Grupo de expresión de microRNAs			Total (%)	p
	Frecuencia (%)				
	1 n=54 (47,4 %)	2 n=12 (10,5 %)	3 n=48 (42,1 %)	114 (100)	
Sexo					
Mujer	21 (41,2)	4 (33,3)	18 (40,9)	43 (37,7)	0,922
Varon	30 (58,8)	8 (66,7)	26 (59,1)	64 (56,1)	
ND	3 (5,6)	-	4 (8,3)	7 (6,1)	
Resección tumoral					
Completa	19 (47,5)	4 (40)	23 (59)	46 (40,4)	0,451
No completa	21 (52,5)	6 (60)	16(41)	43 (37,7)	
ND	14 (25,9)	2 (16,7)	9 (18,8)	25 (21,9)	
Tratamiento					
A	5 (12,5)	1 (10)	8 (22,22)	14 (12,3)	0,192
B	20 (50)	5 (50)	14 (38,9)	39 (34,2)	
C	5 (12,5)	3 (30)	11 (30,6)	19 (16,7)	
D	10 (25)	1 (10)	3 (8,3)	14 (12,3)	
ND	14 (25,9)	2 (16,7)	12 (25)	28 (24,6)	
Tipo tumoral					
ODG	12 (60)	2 (10)	6 (30)	20 (17,5)	0,148
AST	14 (60,9)	0	9 (39,1)	23 (20,2)	
Mixto	3 (75)	0	1 (25)	4 (3,5)	
GBM	25 (37,3)	10 (14,9)	32 (47,8)	67 (58,8)	
Grado tumoral					
II	8 (27,6)	0	2(12,5)	10 (8,8)	-
III	21(72,4)	2 (100)	14 (87,5)	37 (32,5)	
IV	25 (37,3)	10 (14,9)	32 (47,8)	67 (58,8)	
Supervivencia					
vivos	12 (27,9)	1 (9,1)	6 (15,4)	19 (16,7)	0,463
exitus	30 (69,8)	9 (81,8)	27 (17,9)	66 (57,9)	
censurados	1 (2,3)	1 (9,1)	6 (15,4)	8 (7)	
ND	11 (20,4)	1 (8,3)	9 (18,75)	21 (18,4)	

Tratamiento: A: radioterapia y quimioterapia concomitante y adyuvante; B: radioterapia y quimioterapia concomitante o no; C: radioterapia; D: otros. ND: información no disponible. Test estadístico de Fisher para contingencia de la relación variable-grupo. Significación estadística p<0,05

4.5.3 Análisis de las variables clínico-patológicas y moleculares en los grupos determinados por expresión de microRNAs

La distribución de las variables clínico-patológicas en función del grupo de expresión de microRNAs se muestra en la Tabla 8. No se encontró correlación entre los grupos de expresión de microRNAs y el sexo, tipo de tratamiento o de cirugía ni tipo o grado del tumor. En cuanto a la edad, el grupo 3 presenta una media mayor que el grupo 1 ($p = 0,019$).

En cuanto a la correlación entre los grupos obtenidos mediante expresión de microRNAs y otras alteraciones moleculares analizadas, en los tumores de grado IV la amplificación de *EGFR* muestra correlación con el grupo 1 ($p = 0,009$), de modo que 24 de las 25 muestras de este grupo (96 %) presentan amplificación de este gen. La única muestra del grupo 1 sin amplificación de *EGFR*, corresponde a un glioblastoma secundario. *EGFRvIII* se da también con mayor frecuencia en los grupos 1 (56 %) y 2 (70 %) respecto al 3 (30 %) ($p = 0,0463$) y la pérdida de *PTEN* es más frecuente en los grupos 1 y 3 (77,3 y 87,1 % respectivamente), que en el grupo 2 (44 %) ($p = 0,034$). El resto de las variables no mostraron correlación con ninguno de los grupos (Tabla 6 anexo y Figura 15).

En relación a los tumores de grado II y III, se observa una correlación entre la presencia de mutación en *IDH1* y el grupo 1, al que pertenecen el 91,7 % de los mutantes (22/24) ($p < 0,0001$). Asimismo, el 75,9 % de los casos con metilación pertenecen también al grupo 1 ($p = 0,011$). Por otro lado, la pérdida de *PTEN* es más frecuente en el grupo 3, en el que el 78,6 % de las muestras presentan pérdida de este gen ($p = 0,006$).

4.5.4 Análisis de supervivencia en los grupos determinados por expresión de microRNAs

De los 114 casos clasificados en función de la expresión de microRNAs pudimos obtener información de supervivencia para 93, con una mediana de seguimiento de 12 meses (rango intercuartílico: 6-21). Dado que existen diferencias significativas en la tasa de supervivencia de los pacientes con tumores de grado IV respecto a los de grado II ($p = 0,001$) y a los de grado III ($p = 0,043$) el análisis de supervivencia en función de los grupos de expresión de microRNAs se llevó a cabo separando los tumores de grado IV de los tumores de grado III.

No se realizó estudio de supervivencia para los pacientes con tumores de grado II por ser su número insuficiente para este tipo de análisis ($n = 9$).

En la serie de pacientes con tumores de grado IV se incluyeron 56, con datos de grupo de expresión de microRNAs y supervivencia disponibles. Su mediana de supervivencia fue de 12 meses (95% IC: 8,86-15,14), con una supervivencia acumulada a los dos años del 20,9 % (95% IC: 8,16-33,64).

El grupo 1 muestra una supervivencia reducida en comparación con el grupo 3 ($p = 0,001$), mientras que con el grupo 2 la diferencia no alcanzó significación estadística ($p = 0,066$) (figura 16).

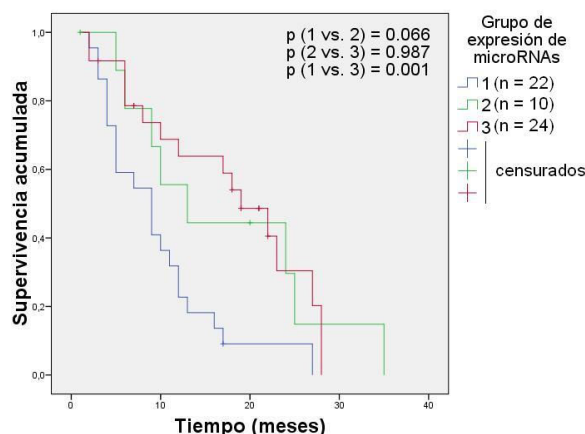


Figura 16. Curvas de supervivencia correspondientes a los pacientes con glioblastoma, estratificación en función del grupo determinado por expresión de microRNAs.

En los pacientes de grado IV, además de las diferencias entre pertenecer al grupo 1 o al grupo 3 de expresión de microRNAs, mostraron efecto sobre la supervivencia en análisis univariante, el tratamiento, el tipo de cirugía, la edad, la amplificación en *EGFR* y la pérdida conjunta de *CDKN2A* y *PTEN*.

Con el fin de comprobar si la pertenencia al grupo 1 confiere peor pronóstico en relación con los otros dos grupos de forma independiente, se incluyó esta variable en un análisis de regresión de Cox múltiple, con las variables moleculares que mostraron impacto en la supervivencia. Para ello, en primer lugar se agruparon las muestras pertenecientes a los grupos 2 y 3 y se analizaron las diferencias en la supervivencia respecto al grupo 1. Se observó que la pertenencia al grupo 1 confiere peor pronóstico ($p = 0,001$; $HR=2.7$), con una mediana de supervivencia de 9 meses (95% IC: 4,5-13,5) frente a una mediana de 19 meses (95% IC: 8,8-29,2) en los pacientes pertenecientes a los otros dos grupos.

En el estudio mediante el modelo multivariante incluimos la edad al diagnóstico, tipo de cirugía, tratamiento (A+B vs. C+D), amplificación de *EGFR*, pérdida conjunta de *CDKN2A* y *PTEN* y pertenencia al grupo 1 de expresión de microRNAs. La pertenencia al grupo 1 resultó ser un factor de peor pronóstico independiente ($p = 0,011$; $HR = 3,12$) en los pacientes con glioblastoma (grado IV). Los valores de p y la razón de riesgo (HR) de las variables incluidas en el modelo se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Análisis COX multivariante en la serie de pacientes con glioblastoma con datos de expresión de microRNAs.

	Regresión de Cox múltiple			
	p	HR	95 % IC para RR	
Tratamiento (C+D vs. A+B)	0,002	3,79	1,64	8,78
Amplificación de <i>EGFR</i>	0,011	4,38	1,4	13,70
Pertenencia al grupo 1	0,011	3,12	1,29	7,51
Cirugía (no total vs. total)	0,022	2,74	1,16	6,47
Pérdida de <i>CDKN2A</i> y <i>PTEN</i>	0,043	0,404	0,168	0,971

Significación estadística $p < 0,05$

En cuanto al grupo de 37 tumores de grado III con asignación a un grupo de expresión de microRNAs, el estudio de supervivencia pudo hacerse sobre 28 de ellos. Esta subpoblación presenta una mediana de supervivencia de 19 meses (95% IC: 13,8-24,2) y una tasa de supervivencia acumulada a los 2 años del 33.8 % (95% IC: 13,2-54,4).

A diferencia de lo obtenido en glioblastomas, la pertenencia al grupo 1 en los pacientes con tumores de grado III confiere mejor pronóstico respecto al grupo 3 ($p = 0,018$; HR=3,3). La mediana de supervivencia en el grupo 1 es de 35 meses (95% IC: 14,4-55,6) y la tasa supervivencia acumulada a los 2 años del 52.4 % (95% IC: 23,8-81,0), frente a una mediana de 14 meses y una tasa de supervivencia acumulada a los 2 años del 12.9 % en el grupo 3 (Figura 17). En el grupo 2 sólo se incluye una muestra.

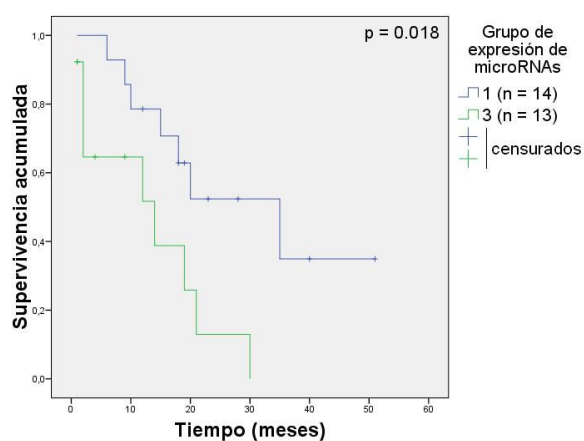


Figura 17. Curvas de supervivencia correspondientes a los pacientes con tumores de grado III, estratificación en función del grupo determinado por expresión de microRNAs.

Con el fin de comprobar si la pertenencia al grupo 1 de expresión de microRNAs confiere mejor pronóstico de forma independiente, llevamos a cabo un análisis de regresión múltiple, incluyendo las variables que mostraron impacto en la supervivencia en este grupo de pacientes con tumores de grado III en el análisis multivariante (edad al diagnóstico, mutación en *IDH1*, delección de *CDKN2A*, delección de *PTEN* y metilación del promotor de *MGMT*). La edad

resultó ser el único factor pronóstico independiente ($p = 0,002$; HR = 6,335), de modo que la pertenencia al grupo 1, ajustada por edad, no mostró impacto sobre la supervivencia ($p = 0,982$; HR = 1,003).

5. DISCUSIÓN

Una de las metas cuyo alcance es necesario en un futuro próximo es el uso de marcadores moleculares que puedan aportar información al realizar el diagnóstico de un tumor de origen glial, determinar el pronóstico del paciente o predecir la respuesta a un tratamiento determinado.

En este trabajo hemos valorado el papel de varias alteraciones moleculares, de la expresión de microRNAs y de la relación de ambas con las características clínicas de los pacientes en una población de gliomas recogidos en el Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), con el objetivo de valorar la utilidad de introducir el análisis de los marcadores que pudieran resultar de utilidad como práctica de rutina hospitalaria.

Hemos analizado un total de 152 gliomas, de los cuales 88 fueron diagnosticados como glioblastoma grado IV, 27 como astrocitomas de grado III, 19 como oligodendrogliomas de grado III, 4 como oligoastrocitomas de grado III, 6 como astrocitomas de grado II, 5 como oligodendrogliomas de grado II y 3 como oligoastrocitomas de grado II. La proporción de tipos histológicos y grados de nuestra serie se corresponde con la proporción descrita en la población. Tanto los análisis de contingencia entre las alteraciones moleculares y de su relación con la expresión de microRNAs, como los análisis de supervivencia se han llevado a cabo separando los tumores en función del grado, ya que este factor, tal y como hemos observado en nuestros datos y como otros autores también han descrito, marca importantes diferencias en cuanto a las características moleculares del tumor y a la supervivencia de los pacientes (Louis y col., 2007). Los tumores de grado II no se han incluido en el análisis de supervivencia por constituir un grupo de número insuficiente para este tipo de análisis.

5.1 Alteraciones moleculares

La amplificación de *EGFR* es la alteración más frecuente en la serie completa de tumores que hemos analizado; muestra correlación directa con el grado, de modo que es más frecuente en glioblastoma de grado IV que en tumores de menor grado. En otros estudios también se ha demostrado esta alta incidencia de la amplificación de *EGFR* en tumores de grado IV, principalmente en aquellos generados *de novo* (glioblastomas primarios) y no así en los glioblastomas secundarios originados a partir de la evolución de tumores de menor grado (Kita y col., 2007; Ohgaki y col., 2004)

Dentro de los gliomas de grado II y III, la amplificación de *EGFR* es más frecuente en astrocitomas que en oligodendrogliomas, con frecuencias del 75 % y del 43,5 %, respectivamente. Esta relación observada entre amplificación de *EGFR* y gliomas de alto grado puede ser útil en el diagnóstico en los casos que tienen una histología compatible con glioma de bajo grado y sobre-expresión de este gen, ya que podrían ser gliomas de mayor grado mal representados en la biopsia.

Tanto en glioblastoma (grado IV) como en gliomas de menor grado hemos encontrado una clara relación entre amplificación de *EGFR* y pérdida de *PTEN*, regulador negativo de la vía PI3K/AKT. El 83 % de los glioblastomas y el 63 % de los gliomas de menor grado con amplificación de *EGFR* tienen también pérdida de *PTEN*. Dado que la presencia de alteraciones en efectores de la misma vía de señalización bajo la modulación de la molécula frente a la que va dirigido un fármaco juega también un papel importante en la efectividad de un tratamiento, la tendencia de la amplificación de *EGFR* y de la pérdida de *PTEN* a darse conjuntamente podría explicar el fracaso de los diversos estudios clínicos con inhibidores de tirosín-kinasas realizados en glioblastomas (Mellinghoff y col., 2005; Prados y col., 2009; Reardon y col., 2010; Uhm y col., 2011). Este hecho subraya la importancia de una adecuada selección de los pacientes, en función de las alteraciones moleculares del tumor, al llevar a cabo ensayos clínicos con terapias dirigidas.

En el grupo de glioblastomas (grado IV) que hemos estudiado, la amplificación de *EGFR* está relacionada con peor pronóstico, con una mediana de supervivencia de 9 meses en los pacientes portadores de tumores con amplificación de este gen, frente a 23 meses en los pacientes sin amplificación; sin embargo, en gliomas de grado III, la estratificación de los pacientes en función de la amplificación de este gen no mostró diferencias en la supervivencia de los pacientes.

La mayoría de los estudios iniciales de *EGFR* en glioblastomas relacionaron su sobre-expresión con peor pronóstico y con un descenso de la supervivencia global en pacientes con este tipo tumoral (Houillier y col., 2006; Shinojima y col., 2003). También se ha descrito que la amplificación de *EGFR* contribuye a la aparición de resistencia a radio y quimioterapia, lo que explicaría por qué los pacientes con glioblastoma responden especialmente mal a este tratamiento (Karpel-Massler y col., 2009; Lo, 2010). Sin embargo, otros estudios no han confirmado esta relación de la sobre-expresión de *EGFR* con la supervivencia global de los pacientes (Benito y col., 2010; Huncharek & Kupelnick, 2000; Liu y col., 2005b). La falta de acuerdo entre los diferentes resultados de *EGFR* como factor pronóstico podría venir dada por el hecho de que, en la mayoría de los casos no se hace una estratificación en función del grado de amplificación del gen ni de otras características, como la edad, que han mostrado definir subgrupos en los que esta alteración puede tener diferentes efectos (Batchelor y col., 2004; Layfield y col., 2006; Smith y col., 2001).

En nuestro estudio, cuando tuvimos en cuenta el grado de amplificación de *EGFR* para el análisis de supervivencia, dividiendo las muestras en 3 grupos en función del valor del ratio resultante del análisis de MLPA en amplificación baja (<2), amplificación moderada (2-20) y amplificación alta (>20), en lugar de hacer la estratificación utilizando las categorías presencia o ausencia, la reducción significativa de la supervivencia sólo se observó cuando la amplificación de *EGFR* es media o baja. Estos resultados concuerdan con los de Hobbs y col., en los que demuestran, mediante análisis FISH, que los tumores que presentan sobre-expresión baja o moderada de *EGFR* tienen peor respuesta a terapias basadas en temozolomida como adyuvante que aquéllos en los que *EGFR* está altamente sobre-expresado (más de 20 copias de *EGFR* por copia de cromosoma 7) o no presenta sobre-expresión (Hobbs y col., 2012). En

cualquier caso, serán necesarios más estudios prospectivos para corroborar si el grado de amplificación de *EGFR* es relevante como marcador, así como para valorar la concordancia entre las distintas técnicas comúnmente utilizadas para evaluar la amplificación de *EGFR*.

En este sentido y dado que el análisis de *EGFR* es frecuentemente realizado mediante FISH e inmunohistoquímica, tanto en investigación como en la práctica hospitalaria, hemos analizado 25 de las muestras también mediante estas dos técnicas, con el objetivo de comparar entre sí los resultados proporcionados por las 3 técnicas. La correlación de los resultados de FISH con los datos de MLPA para la amplificación de *EGFR* fue moderada (índice Kappa = 0,589), sin embargo, el MLPA mostró mayor correlación con los niveles de proteína determinados por inmunohistoquímica (índice Kappa = 0,516) que el FISH (índice Kappa = 0,326). Estos datos, además de las ventajas que supone la utilización de MLPA ya que permite el análisis del número de copias de varios genes en una sola reacción de amplificación, hacen de esta técnica un candidato a tener en cuenta para el análisis de rutina.

Por otra parte, en nuestros tumores de grado III, tanto la pérdida de *PTEN* como la pérdida de *CDKN2A* han resultado ser indicadores de peor pronóstico. Estos resultados concuerdan con la mayoría de los estudios publicados (Ermoian y col., 2002; Liu y col., 2011; Sasaki y col., 2001; Smith y col., 2001).

Por el contrario, en el estudio de los pacientes con glioblastoma (grado IV), observamos una tendencia estadística a mayor supervivencia en los casos con pérdida de *PTEN* y la pérdida conjunta de este gen y de *CDKN2A* mostró conferir mejor pronóstico de forma significativa.

Aunque está descrito que la expresión de *PTEN* está asociada con peor supervivencia en pacientes con glioblastoma y otros tipos de glioma, existen estudios recientes que sugieren que la pérdida de expresión de *PTEN* no confiere un descenso en la supervivencia de pacientes tratados con temozolomida (Carico y col., 2012). Además, estudios *in vitro* han mostrado que la pérdida de *PTEN* confiere sensibilidad a análogos de la temozolomida en astrocitos murinos y en líneas celulares de glioma humano (McEllin y col., 2010). De hecho, en la estratificación de nuestros pacientes de glioblastoma en función del tratamiento, aunque el número de pacientes en cada grupo era reducido, la tendencia a mayor supervivencia de los pacientes con pérdida de *PTEN* sólo se observa en aquéllos pertenecientes al grupo de tratamiento A + B,

que incluye quimioterapia principalmente basada en temozolomida además de la radioterapia ($p = 0,061$).

El hecho de que la pérdida combinada de *PTEN* y *CDKN2A* confiera mejor pronóstico en pacientes con glioblastoma sugiere que las alteraciones en las vías RB y p53, debidas a la pérdida de *CDKN2A*, podrían estar implicadas en la sensibilidad al tratamiento e incluso potenciarla.

En relación a la metilación del promotor de *MGMT*, esta alteración ha suscitado gran interés entre los clínicos ante la posibilidad de poder ser utilizada como predictor de respuesta a tratamiento. En nuestro estudio este marcador no reveló ninguna correlación con la supervivencia en el grupo de pacientes con glioblastoma, sin embargo sí observamos que en tumores de grado III ejerce un efecto estadísticamente significativo sobre la supervivencia de los pacientes. Varios estudios sugieren que el silenciamiento de *MGMT*, por metilación de su promotor, resulta un factor de buen pronóstico en gliomas anaplásicos (Jiang y col., 2013; Tabatabai y col., 2010; van den Bent y col., 2009; Wick y col., 2009; Yang y col., 2013b). El valor pronóstico o predictivo del silenciamiento de *MGMT* por metilación de su promotor sigue generando controversia. Por un lado, existen importantes trabajos, derivados de ensayos clínicos en fase 3 que han mostrado diferencias significativas en la supervivencia de estos pacientes en relación con los que no presentaban metilación en este gen, independientemente del tratamiento administrado (Hegi y col., 2005; Stupp y col., 2009; Stupp y col., 2005). Weller y col. revisaron los trabajos recientes en los que se estudia la metilación del promotor de *MGMT* como factor predictor de respuesta al tratamiento con temozolomida (Weller y col., 2010). Sin embargo, en varios estudios no se ha demostrado correlación entre la metilación del promotor de *MGMT* y la supervivencia global o a la progresión libre de enfermedad (Combs y col., 2011; Costa y col., 2010; Park y col., 2009).

En nuestro estudio, como ya se ha mostrado en los resultados, sólo observamos efecto sobre la supervivencia de los pacientes con glioblastoma (grado IV) al realizar estratificaciones en función del tratamiento. En el grupo de pacientes con glioblastoma y con metilación de *MGMT* no se encontraron diferencias de supervivencia significativas entre los que fueron

tratados con quimioterapia más radioterapia frente a los que fueron tratados sólo con radioterapia o no fueron tratados. Por otra parte, en el grupo de pacientes sin esta alteración, los tratamientos más completos (radioterapia más quimioterapia) son los que parecieron conferir mayor beneficio en relación con la supervivencia. Es más, observamos que la presencia de metilación en el promotor de este gen resulta favorable sólo en el grupo de pacientes que recibieron únicamente radioterapia o tratamientos no estándar.

El hecho de que no haya diferencias en la supervivencia de los pacientes con metilación de *MGMT* en función del tratamiento recibido nos sugiere que en pacientes con glioblastoma esta alteración parece tener un papel pronóstico, más que predictivo de respuesta a tratamiento o bien podría promover la adquisición de otras alteraciones que regulan el crecimiento tumoral, como ya ha sido propuesto en otros estudios (Cancer Genome Atlas Research, 2008; Rivera y col., 2010). Los resultados conflictivos obtenidos en el grupo de pacientes con glioblastoma nos sugieren que aún debe tomarse con precaución la información aportada por este marcador en cuanto a su utilización para la toma de decisiones sobre el establecimiento del tratamiento más adecuado para cada paciente.

Uno de los mayores problemas para la introducción en la clínica de la determinación de la metilación de *MGMT* es la falta de consenso sobre el método de análisis más adecuado, tanto para los requerimientos de los ensayos clínicos, como para el diagnóstico de rutina. Una de las ventajas de analizar el estado de metilación del gen, en lugar de la expresión de RNA o de los niveles de proteína, es que la metilación es característica sólo de células gliales neoplásicas, mientras que los niveles de mRNA o de proteína pueden verse incrementados por la presencia de tejidos circundantes no tumorales en la muestra. La inmunohistoquímica, por sí sola, puede facilitar el procedimiento diagnóstico pero no refleja uniformemente el estado de metilación de *MGMT* (Felsberg y col., 2009; Iliadis y col., 2012). No obstante, en un estudio reciente (Lalezari y col., 2013) se demostró que la utilización de PCR específica de metilación (MSP) combinada con inmunohistoquímica para el estudio de *MGMT* puede proporcionar una mejor correlación con el pronóstico que la MSP por sí sola.

En este trabajo hemos utilizado MSP (Herman y col., 1996) con oligonucleótidos específicos para la amplificación de DNA metilado o no metilado, previamente modificado mediante

bisulfito sódico (Esteller y col., 2000); los fragmentos resultantes pueden ser analizados por electroforesis convencional, como ha sido nuestro caso, o bien, se pueden utilizar aproximaciones basadas en PCR cuantitativa a tiempo real, que permiten cierto grado de cuantificación. Aunque nuestro estudio es cualitativo, abarca los sitios CpG más frecuentemente analizados en gliomas (Bady y col., 2012; Esteller y col., 2000). Sin embargo, la interpretación de los casos al límite de detección podría repercutir en las conclusiones finales en cuanto a la metilación de *MGMT* como factor pronóstico o predictivo.

Otras aproximaciones cuantitativas o semi-cuantitativas para la determinación de la metilación de este gen se basan en el análisis mediante MLPA específico de metilación (MS-MLPA), también utilizado en ensayos clínicos (van den Bent y col., 2009), y en el análisis por pirosecuenciación. Ésta sí es una técnica cuantitativa y los estudios basados en este tipo de análisis han mostrado asociación entre el grado de metilación de *MGMT* y el pronóstico de los pacientes (Dunn y col., 2009; Karayan-Tapon y col., 2010). No obstante, la pirosecuenciación también tiene limitaciones, como la necesidad de determinar el porcentaje umbral de metilación y su validación clínica.

En un estudio reciente (Christians y col., 2012) se comparó el análisis de la metilación de *MGMT* mediante las técnicas de MSP (que hemos utilizado nosotros), MS-MLPA y pirosecuenciación y su correlación con diferentes parámetros pronósticos, como supervivencia libre de progresión y supervivencia media de los pacientes. Los resultados obtenidos por pirosecuenciación, especialmente cuando se convierte la variable continua en dicotómica utilizando un punto de corte adecuado, relacionan significativamente la presencia de metilación con un aumento de la supervivencia libre de progresión y de la supervivencia global, mientras que en los valores obtenidos mediante MS-MLPA esta asociación no resulta tan clara. En cuanto a la MSP, cuando se aplica una valoración semicuantitativa, sólo se encontraron diferencias significativas en la supervivencia libre de progresión en los casos con elevada metilación. Sin embargo, cuando se realiza el análisis cualitativo convencional de estos datos, hay diferencias significativas tanto en la supervivencia libre de progresión como en la supervivencia media. En cualquier caso, es necesaria la validación clínica de estas

técnicas, valorando la posibilidad de tener en cuenta también el análisis de la expresión del gen.

Otra de las alteraciones moleculares de descubrimiento reciente y de interés en gliomas es la presencia de mutaciones en *IDHI*; en nuestro estudio muestra correlación inversa con la amplificación de *EGFR* y con la pérdida de *PTEN* y directa con la metilación del promotor de *MGMT*. En tumores de grado II y III todas las muestras con pérdida de las regiones cromosómicas 1p y 19q tienen mutación en *IDHI*, tal y como ha sido descrito previamente (Labussiere y col., 2010). Además, hemos encontrado correlación inversa entre la presencia de mutaciones en *IDHI* y el grado tumoral, así como con la edad de los pacientes.

En diversos estudios se ha relacionado la presencia de mutaciones en *IDHI* con menor edad al diagnóstico en glioblastomas secundarios, astrocitomas anaplásicos y oligoastrocitomas anaplásicos, pero no en gliomas difusos; en estos últimos, contrariamente, parece estar asociada a pacientes de mayor edad (Kim y col., 2010).

En cuanto al tipo histológico, la mutación en *IDHI* se da por igual en astrocitomas y oligodendrogliomas, lo que apoya la hipótesis de que esta alteración es un evento temprano en la gliomagénesis que se produce en un antecesor común de las líneas astrocítica y oligodendrogliar. Por otra parte, el hecho de que las mutaciones en *IDHI* muestren correlación con alteraciones propias de gliomas de bajo grado y sean excluyentes con otras alteraciones características de gliomas de alto grado, como amplificación de *EGFR* y pérdida del cromosoma 10, proporciona una evidencia más de que los glioblastomas secundarios se desarrollan a través de la progresión de un astrocitoma de menor grado, siendo una entidad clínica y genéticamente distinta a los glioblastomas primarios (Hartmann y col., 2011; Lai y col., 2011; Parsons y col., 2008; Watanabe y col., 2009). Así, el conjunto de alteraciones que alberga cada tumor define una vía oncogénica para su desarrollo y evolución; el análisis de algunas de ellas puede constituir una herramienta útil para el diagnóstico diferencial, que en muchas ocasiones resulta complicado con la utilización de criterios histopatológicos (Tabatabai y col., 2010).

En el análisis univariante de nuestros datos, la presencia de mutaciones en *IDH1* es la alteración molecular con mayor efecto sobre la supervivencia de los pacientes de grado III, con una mediana de supervivencia de 35 meses frente a 15 meses en los pacientes cuyos tumores no portan mutación. El importante valor pronóstico de las mutaciones en *IDH1* ha sido establecido en pacientes con glioblastoma secundario, gliomas anaplásicos y gliomas difusos; en todos ellos ha sido relacionado con mejor pronóstico y mayor supervivencia media de los pacientes. ((Hartmann y col., 2010; Sanson y col., 2009; Watanabe y col., 2009; Yan y col., 2009). Incluso, en un estudio con 382 casos, los astrocitomas anaplásicos de grado III sin mutación en *IDH1* resultaron de peor pronóstico que los glioblastomas con mutación en *IDH1*, aun siendo de menor grado (Hartmann y col., 2010). En nuestro caso, el reducido número de glioblastomas secundarios presentes y, por tanto, la baja incidencia de mutaciones en *IDH1*, ha imposibilitado la evaluación del impacto de esta alteración sobre la supervivencia de pacientes con este tipo de glioblastoma.

En cuanto a la influencia sobre la supervivencia de las variables clínicas analizadas en nuestro estudio, la extensión de la resección tumoral constituye un importante factor pronóstico en glioblastoma (grado IV), por lo que es necesario, además del análisis de alteraciones moleculares, encaminar los esfuerzos a desarrollar técnicas que permitan una cirugía lo más extensa posible (Eyupoglu y col., 2013). También observamos que el tratamiento postquirúrgico influye en la supervivencia de los pacientes con glioblastoma; sin embargo, este resultado está limitado por el hecho de que los pacientes que no fueron incluidos en los grupos de tratamiento que denominamos A y B mostraban un estado inicial peor. Cabe destacar que en pacientes con glioblastoma mayores de 60 años no se encontraron diferencias significativas en la supervivencia en función del grupo de tratamiento postquirúrgico mientras que el efecto de la extensión de la cirugía sigue siendo significativo en ese grupo de edad, donde podría tener aún más importancia (Konglund y col., 2013).

En tumores de grado III, la única variable clínica que mostró impacto sobre la supervivencia en nuestro estudio fue la edad al diagnóstico, que resultó además el único factor pronóstico independiente en análisis multivariante. Esto sugiere que el impacto en la supervivencia de la presencia de mutaciones en *IDH1*, factor de buen pronóstico en análisis univariante, podría

estar relacionado con la tendencia de esta alteración a aparecer en pacientes de menor edad (Kim y col., 2010; Parsons y col., 2008; Yan y col., 2009). Otra de las hipótesis, apoyada además por la correlación directa que hemos observado entre mutación en *IDH1* y metilación del promotor de *MGMT*, es que el aumento de la supervivencia en pacientes con tumores de grado III portadores de mutación en *IDH1* podría estar relacionado con la inducción de una desregulación epigenética a lo largo de todo el genoma, relacionada con mayor supervivencia (Noushmehr y col., 2010; Turcan y col., 2012). Por otra parte, en algunos de los estudios en los que las mutaciones en *IDH1* mostraron influencia en la supervivencia no se llevó a cabo ajuste en función de la edad (Yan y col., 2009); sin embargo, en la mayoría de ellos sí se ha tenido en cuenta ese ajuste (Hartmann y col., 2010; Metellus y col., 2010; Sanson y col., 2009), de modo que nuestras diferencias podrían venir dadas por características de la serie, como una mayor dispersión de los datos de edad.

En cualquier caso, las mutaciones en *IDH1* constituyen, a día de hoy, un marcador de ayuda en el diagnóstico diferencial de los gliomas e *IDH1* podría constituir también una nueva diana terapéutica. A pesar de que en la actualidad no hay ninguna terapia dirigida disponible, un estudio reciente ha demostrado que el compuesto AGI-5198, inhibidor de la producción de D-2-hidroxiglutarato por la forma mutada R132H de *IDH1*, disminuye el crecimiento y promueve la diferenciación de células de glioma, lo que sugiere un papel de *IDH1* en la gliomagénesis más allá de sus efectos epigenéticos (Rohle y col., 2013).

Por otra parte, como ya se ha indicado en nuestros resultados, en el grupo de pacientes con glioblastoma (grado IV), todas las variables que resultaron conferir diferencias de supervivencia en análisis univariante, excepto la edad, mostraron valor pronóstico independiente en análisis multivariante (extensión de la cirugía, grupo de tratamiento, amplificación de *EGFR* y pérdida conjunta de *CDKN2A* y *PTEN*). Estas alteraciones moleculares podrían tener un papel como marcadores moleculares en glioblastoma, y consideramos que puede ser interesante evaluarlas nuevamente en un estudio prospectivo.

La co-delección de 1p/19q es otro de los marcadores moleculares que ha resultado un factor pronóstico importante en glioma, principalmente en oligodendrogliomas de grado III (Gupta & Salunke, 2012). En nuestro estudio, la incidencia de esta alteración es demasiado baja, de modo que los datos son insuficientes para llevar a cabo un análisis de la supervivencia; sin embargo, el hecho de que los 4 pacientes con esta pérdida permanecieran vivos al cierre del estudio puede proporcionar indicios sobre su importancia como factor de buen pronóstico.

Aunque el valor pronóstico y predictivo de respuesta a tratamiento de cada una de las alteraciones moleculares de forma independiente ha generado controversia, el conjunto de ellas podría resultar una herramienta útil para la elaboración de una clasificación molecular, que pueda aportar información relevante a la clasificación histopatológica actual, como el origen celular y la secuencia de mecanismos que conducen el desarrollo y mantenimiento tumoral para dar lugar a cada subtipo, de modo que se pueda obtener una mayor correlación con el pronóstico y se pueda establecer el tratamiento más adecuado para cada tipo tumoral o incluso para cada paciente, ya que la heterogeneidad intratumoral constituye uno de los obstáculos más importantes a la hora de clasificar y desarrollar tratamientos efectivos en gliomas (Sottoriva y col., 2013).

Para comprender esta heterogeneidad, es imprescindible el conocimiento de las características genéticas y epigenéticas subyacentes al desarrollo tumoral, entre las que también se encuentra la regulación ejercida por microRNAs, que han ido cobrando importancia a medida que se ha ido ampliando el conocimiento sobre sus funciones; de hecho, constituyen una de las clases más abundantes de moléculas reguladoras en organismos multicelulares (Fire y col., 1998).

5.2 Patrones de expresión de microRNAs

En este estudio hemos evaluado la expresión de 364 microRNAs en una serie de gliomas y tejidos cerebrales normales mediante el uso de arrays de baja densidad de PCR cuantitativa a tiempo real. El análisis no supervisado de estos datos de forma independiente nos ha permitido diferenciar muestras normales de las de este tipo tumoral. Ya en 2005, Lu y col. analizaron la expresión de microRNAs en leucemias y diversos tumores sólidos mediante hibridación con sondas fijadas sobre microesferas y demostraron que los diferentes patrones de expresión dan

lugar a una clasificación que se correlaciona con la línea de desarrollo y el estado de diferenciación de cada tumor (Lu y col., 2005). En nuestro caso, con el fin de comprobar que, con el método que hemos utilizado, la capacidad de la expresión de microRNAs para diferenciar gliomas de tejido cerebral normal era también ampliable a otros tipos de tejido, analizamos adicionalmente la expresión de los mismos microRNAs en tejido mamario normal y tumoral. Nuevamente, el análisis no supervisado de los datos permitió diferenciar las muestras de mama y de tejido cerebral normal entre sí y de sus correspondientes tumores.

La mayor parte de los microRNAs que encontramos expresados diferencialmente estaban reprimidos en el tumor respecto al tejido sano. En el estudio de Lu y col., aún siendo realizado el análisis mediante un procedimiento distinto, encontraron también que la expresión de microRNAs en cada tipo tumoral mostraba una marcada reducción en comparación con los tejidos sanos correspondientes; sin embargo, en otro estudio en el que se utilizaron arrays de hibridación se ha encontrado un número mayor de microRNAs sobre-expresados que reprimidos en diversos tumores sólidos (Volinia y col., 2006).

Los microRNAs sobre-expresados de manera significativa en los gliomas de nuestro estudio son miR-10b, miR-196b, miR-594, miR-196a, miR-10a, miR-182, miR-629, miR-183, miR-565, miR-21, miR-542-5p y miR-615. La mayor parte de estos microRNAs han sido descritos recientemente como sobre-expresados en tumores cerebrales y han mostrado relación con la supervivencia de los pacientes y con diversos mecanismos de regulación del crecimiento y proliferación del tumor (Guan y col., 2010; Jiang y col., 2010; Lakomy y col., 2011; Lavon y col., 2010; Papagiannakopoulos y col., 2008; Tanaka y col., 2013).

Cabe destacar que miR10, miR-196 y miR-615 se sitúan en clusters *HOX* de vertebrados, que participan en la regionalización del eje corporal antero-posterior. Estos genes están en clusters altamente conservados que también contienen genes de microRNAs. La familia miR-10 se encuentra asociada a la posición de los parálogos *Hox-4*; miR196 está situado en el extremo 5' de los parálogos *Hox-9* y miR-615 se localiza en un intrón de *HoxC5*.

Los genes *HOX* se expresan a lo largo de este eje en una secuencia que se corresponde con su posición dentro del cluster, de modo que un gen localizado hacia 3' tiene un dominio de expresión en la parte más anterior del eje corporal (Woltering & Durston, 2008).

Generalmente, los microRNAs incluidos dentro de clusters HOX participan en la regulación de genes HOX situados preferentemente hacia el extremo 3' del locus donde se sitúa el microRNA, es decir, reprimen la programación celular de partes más anteriores favoreciendo la prevalencia posterior (Yekta y col., 2008).

La relación de miR-10b con los gliomas parece estar claramente establecida; su inhibición reduce el crecimiento celular mediante arresto del ciclo celular e inducción de apoptosis (Gabriely y col., 2011), aparece sobre-expresado en gliomas y mayores niveles de éste se correlacionan con mayor grado tumoral; además, los niveles de mRNA de la GTPasa RhoC y del receptor del activador de plasminógeno tipo urokinasa (uPAR) también se correlacionan con los niveles de este microRNA. Estas proteínas, que contribuyen a la migración e invasión celular, parecen estar reguladas por miR-10b a través de HOXD10 (Sasayama y col., 2009). Por su parte, miR-196 también se ha encontrado sobre-expresado en glioblastomas en comparación con tumores de menor grado y con tejidos normales. Una elevada expresión de este microRNA se corresponde con peor supervivencia y su nivel de expresión también se correlaciona con el grado tumoral (Guan y col., 2010; Lakomy y col., 2011) por lo que podría ser considerado como factor pronóstico y de progresión tumoral. El papel de miR-615 en gliomas se desconoce y hasta nuestro estudio no se ha encontrado sobre-expresado en gliomas; su papel en otros tipos tumorales tampoco está claro, sin embargo, su implicación en la regulación de los genes *HOX* sugiere que podría tener un papel importante en el desarrollo tumoral, al igual que miR-10 y miR-196.

La función de miR-629, miR-594, miR-565 y miR-542-5p en el desarrollo y progresión de los gliomas tampoco ha sido establecida. Sin embargo, miR-629 aumenta la transformación celular y el desarrollo tumoral en hígado mediante la supresión de HNF4 α , factor de transcripción necesario para la diferenciación de hepatocitos (Schwabe & Wang, 2011); miR-594 y miR-565 están reprimidos durante la diferenciación miogénica (Dmitriev y col., 2013) y miR-542-5p ha mostrado sobre-expresión en carcinoma de células basales y en cáncer rectal (Gaedcke y col., 2012; Sand y col., 2012). En contraposición, miR-542-5p también ha resultado reprimido en varios tipos tumorales como carcinoma papilar de tiroides con metástasis en nódulo linfático (Wang y col., 2013).

Basándonos en la sobre-expresión de estos microRNAs en gliomas respecto a tejido cerebral normal que hemos observado y en el papel que desempeñan en gliomas y en otros tipos tumorales, estos microRNAs podrían ser buenos candidatos para la realización de más estudios con el fin de esclarecer su relación con el desarrollo, mantenimiento y proliferación de los gliomas.

Otro de los microRNAs sobre-expresados en gliomas en nuestro estudio es miR-21, si bien la significación estadística y la magnitud de su sobre-expresión no están entre las más destacadas en nuestros resultados. Este microRNA fue el primero asociado a la malignidad del glioma, así como de otros tipos tumorales (Chan y col., 2005) y existen numerosos estudios en los que muestran que sus niveles están elevados en tejidos y células de glioma en comparación con las células gliales normales, correlacionando, además, este aumento con el grado tumoral, mientras que unos niveles más reducidos aumentan ligeramente la supervivencia. Se ha demostrado que miR-21 promueve la migración e invasión de células de glioma a través de la activación de metaloproteinasas de matriz mediante represión de sus inhibidores *RECK* y *TIMP3* (Gabriely y col., 2008). Otras dianas de miR-21 importantes en gliomas son *PDCD4*, que codifica una de las proteínas que intervienen en la apoptosis (Chen y col., 2008) y *PTEN* (Zhou y col., 2010a). La inhibición de miR-21 induce apoptosis, inhibe la invasión, disminuye el crecimiento del tumor e induce quimiosensibilización (Conti y col., 2009; Corsten y col., 2007; Malzkorn y col., 2010). La inhibición de miR-21 en líneas celulares de glioblastoma también ha mostrado desencadenar apoptosis mediada por las caspasas mitocondriales 9 y 3 (Zhou y col., 2010b) y potenciar la quimiosensibilidad al taxol mediante la represión de la expresión y de la fosforilación del factor activador de la transcripción STAT3 (Ren y col., 2010). Además, otros estudios en líneas celulares de glioma han mostrado que miR-21 reprime la apoptosis mediada por p53 en respuesta a agentes quimioterapéuticos como doxorubicina, contribuyendo a la quimioresistencia (Papagiannakopoulos y col., 2008).

Por otro lado, hemos encontrado que en los tumores gliales es más frecuente la represión de numerosos microRNAs (Tabla 1 anexo); muchos de ellos han sido también relacionados con gliomas en otros estudios (Chang y col., 2012; Chen y col., 2012; Haapa-Paananen y col., 2013; He y col., 2013; Hua y col., 2012; Karsy y col., 2012; Laddha y col., 2013; Ma y col., 2012; Pan y col., 2012; Roth y col., 2011; Shi y col., 2008; Skalsky & Cullen, 2011; Slaby y col., 2010; Wang y col., 2012; Xia y col., 2013; Xu y col., 2010; Yang y col., 2013a), mientras para otros no se ha descrito el papel que pudieran tener en el desarrollo y mantenimiento de este tipo tumoral. No obstante, la mayoría de los microRNAs que muestran represión en nuestra serie de tumores gliales tienen funciones relacionadas con la supresión tumoral y podrían constituir importantes armas terapéuticas para desarrollar tratamientos más efectivos contra este tipo de tumor.

En cuanto a los tipos histológicos de nuestros tumores, determinados según los criterios establecidos por la OMS, el análisis supervisado de la expresión de microRNAs no logró una segregación adecuada de estos grupos, lo que nos llevó a un análisis no supervisado de los datos en busca de diferencias que pudieran establecer grupos de tumores más allá de los establecidos por la OMS. Así, en este estudio, basándonos en la expresión de microRNAs, hemos definido 3 grupos de gliomas, cada uno caracterizado por una expresión diferencial de microRNAs correspondientes a diversas vías biológicas y relacionado con determinadas alteraciones moleculares previamente analizadas.

El grupo 1 muestra alta frecuencia de casos con mutación en *IDH1*, metilación del promotor de *MGMT*, amplificación de *EGFR* y pérdida de *PTEN*, de modo que es el grupo asociado a un mayor número de alteraciones moleculares. Este grupo muestra expresión diferencial, respecto al tejido cerebral normal, del 81 % de los microRNAs etiquetados como “supresores de tumores” (Lu y col., 2010), todos ellos con expresión reducida; se caracteriza además por una expresión de miR-9 más elevada que el resto de los grupos. Este microRNA ha sido descrito como represor de la vía JAK/STAT, funcionando como interruptor que regula las decisiones oligodendrogiales frente a las mesenquimales, de modo que su sobreexpresión impide la diferenciación mesenquimal. En líneas celulares de glioblastoma, la expresión de

miméticos de miR-9 disminuye la expresión de marcadores astrocíticos y mesenquimales, aumenta la expresión de marcadores neuronales e impide la proliferación de células madre de glioma. (Kim y col., 2011).

El grupo 1 muestra también una expresión global más reducida de microRNAs catalogados como “onco-miRNAs” que el resto de los grupos, principalmente de miR-21. El hecho de que el grupo 1 muestre represión de miR-21 y de otros onco-miRNAs respecto al resto de grupos tumorales nos sugirió que podría constituir un grupo de mejor pronóstico.

El grupo 2 se caracteriza por la ausencia total de casos con mutación en *IDH1* y menor expresión de microRNAs catalogados como específicos de cerebro que el resto de los grupos, principalmente de miR-9, que como ya se ha indicado favorece la diferenciación oligodendroglial frente a la mesenquimal e inhibe el crecimiento de las células madre de glioma. Este grupo está también caracterizado por una expresión reducida de miR-124a; este microRNA, que también se ha encontrado reprimido en glioblastomas en otros estudios, participa en mecanismos de invasión y migración de modo que su sobre-expresión en líneas celulares de glioblastoma resulta en una inhibición de estos mecanismos (Fowler y col., 2011).

El grupo 3 se caracteriza por mayor expresión de microRNAs antiproliferativos y supresores de tumores que los otros dos grupos, principalmente de miR-124a así como de miR-1 y de miembros de la familia let-7. Hasta nuestro estudio, miR-1 no ha sido descrito como sobre-expresado ni reprimido en gliomas. Sin embargo, en otros tipos de neoplasia tiene un papel supresor de tumores, por ejemplo inhibiendo la proliferación de células de hepatocarcinoma a través de la endotelina-1 (Li y col., 2012).

Los miembros de la familia let-7 han mostrado, *in vitro*, capacidad para reducir la proliferación y la migración en líneas celulares de glioblastoma, mediante una reducción de la expresión de *N-RAS*, *K-RAS* y *pan-RAS*; además, reduce el tamaño de los tumores generados por el trasplante de estas células en ratones atímicos (Lee y col., 2011).

Estos tres grupos determinados por el perfil de expresión de microRNAs tienen en común la expresión diferencial de un alto porcentaje de microRNAs supresores de tumores; todos ellos

reprimidos en tumor en comparación con el tejido normal. Por ejemplo, miR-101 muestra expresión reducida en todos los grupos en relación con el tejido normal; en otros estudios este microRNA se ha encontrado reprimido en gliomas y ha demostrado su implicación en la proliferación, migración y angiogénesis en este tipo tumoral. Su sobre-expresión reduce el crecimiento tumoral a través de la represión de EZH2, una histona-lisina metiltransferasa que pertenece a una familia del grupo Polycomb, cuyos miembros forman complejos proteicos multiméricos implicados en el mantenimiento de la represión transcripcional de determinados genes a lo largo de la división celular (Smits y col., 2010). Asimismo, en concordancia con nuestros datos, miR-181b y miR-181c han sido también identificados como reprimidos en gliomas (Ciafre y col., 2005) y estudios posteriores han mostrado la capacidad de miR-181b para inhibir el crecimiento tumoral e inducir apoptosis en células de glioma. Además miR-181b y miR-181c están significativamente reprimidos en los glioblastomas de pacientes que respondieron al tratamiento con radioterapia y temozolomida, en comparación con los niveles de los pacientes, sometidos al mismo tratamiento, que desarrollaron progresión. Por tanto, los niveles de expresión de estos microRNAs podrían servir como marcadores predictivos de respuesta a radiación en pacientes con glioblastoma (Shi y col., 2008; Slaby y col., 2010).

Así como en el resto de los grupos todos los microRNAs diferencialmente expresados entre controles y tumores etiquetados por el programa TAM como supresores de tumores muestran expresión reducida, cabe destacar que dentro del grupo 3 los microRNAs miR-141 y miR-451, también etiquetados como tal, muestran sobre-expresión. En estudios con líneas celulares de glioma, la sobreexpresión de miR-451 inhibe el crecimiento, induciendo arresto del ciclo celular en G0/G1, incrementa la apoptosis y también disminuye la capacidad de invasión. La sobreexpresión de este microRNA resulta en una reducción de Akt, ciclina D1, MMP-2, MMP-9 y Bcl-2, mientras que la expresión del supresor de tumores p27 aumenta. Por tanto, la actividad antitumoral de miR-451 podría estar mediada por las vías en las que intervienen estos genes (Nan y col., 2010).

A pesar del papel supresor de tumores descrito para miR-451, también se ha demostrado una relación entre el aumento de los niveles de este microRNA y la reducción de la supervivencia de los pacientes (Godlewski y col., 2010). Según este estudio, miR-451 controla la

proliferación, la migración y la respuesta a restricción energética, de modo que en condiciones normales, con un nivel adecuado de glucosa, se permite una expresión relativamente alta de miR-451, lo que promueve el crecimiento celular. Cuando la concentración de glucosa es baja los niveles de miR-451 descienden, disminuyendo la proliferación, pero aumentando la migración y la supervivencia, para resistir el estrés metabólico. Estos efectos están mediados por LKB1, que se reprime por disminución de una de las dianas de miR-451, CAB39. Esta proteína forma parte del complejo de LKB1 y es necesaria para su actividad, suprime el crecimiento y la proliferación celular cuando hay restricción de nutrientes, de modo que la represión de miR-451 resulta en una disminución del crecimiento, a través del aumento de expresión de *CAB39*. Este papel de miR-451 en la proliferación tumoral apoya la posibilidad de que la sobre-expresión que hemos encontrado en nuestros tumores del grupo 3 pueda tener importancia en el desarrollo tumoral de este grupo.

Por otra parte, miR-141 no ha sido relacionado hasta este estudio con gliomas, sin embargo en otros tipos tumorales sí ha mostrado actuar como represor tumoral (Luo y col., 2013).

Los grupos 2 y 3 muestran también expresión diferencial, respecto al tejido normal, de gran parte de los microRNAs englobados por el programa TAM en la categoría de microRNAs específicos de cerebro; todos ellos reprimidos; de éstos, miR-330 se ha encontrado también reprimido en biopsias y líneas celulares de glioma en otro estudio (Gaur y col., 2007), sin embargo, esta reducción observada está en contraposición con un estudio reciente en el que se encontró correlación entre la sobre-expresión de miR-330 y el aumento de la proliferación, migración, e invasión de líneas celulares de glioblastoma (Qu y col., 2012). En otros tipos celulares ha sido descrito como supresor tumoral, de modo que en líneas celulares de próstata inhibe la motilidad celular mediante la reducción de los niveles del factor de transcripción Sp1 e induce apoptosis mediante la supresión de la fosforilación de Akt por E2F1 (Lee y col., 2009; Mao y col., 2013). Además, en líneas celulares de cáncer colorrectal disminuye la proliferación celular a través de la reducción de los niveles de Cdc42, miembro de la familia de GTPasas Rho, que se han encontrado sobre-expresadas en varios tipos tumorales (Li y col., 2013). El hecho de que en nuestra serie de gliomas y en los resultados de Gaur y col. aparezca

reprimido sugiere que en gliomas podría también tener un papel como supresor de tumores, más en concordancia con lo descrito en otros tipos tumorales.

Teniendo en cuenta la expresión de los microRNAs que caracterizan cada grupo y las funciones que han sido descritas para ellos, cabría esperar que los pacientes con tumores clasificados en el grupo 1 y en el grupo 3 tuvieran mayor supervivencia que los pertenecientes al grupo 2; ya que el grupo 1 presenta expresión reducida del onco-miRNA miR-21 y aumentada del supresor de tumores miR-9 y el grupo 3 se caracteriza por sobre-expresión de microRNAs supresores de tumores como miR-1, miR-124a y let-7, mientras que el grupo 2 se caracteriza por menor expresión de miR-9 y 124a, ambos con papeles antitumorales. Sin embargo, la pertenencia al grupo 1 sólo está relacionada con mayor supervivencia dentro de los tumores de grado III, y esta significación se pierde cuando se hace un ajuste por edad mediante análisis multivariante.

Por otra parte, la supervivencia de los pacientes cuyos tumores se clasifican en los grupos 2 y 3 no presenta diferencias. Sin embargo, en el grupo de pacientes con glioblastoma (grado IV), la pertenencia al grupo 1, lejos de ser factor de buen pronóstico, está relacionada con una supervivencia significativamente reducida respecto a los otros dos grupos, que no muestran diferencias entre sí.

En principio, los datos de las alteraciones génicas características de cada grupo hacen pensar que la reducida supervivencia de los pacientes cuyos tumores se clasifican en el grupo 1 podría ser debida al alto número de éstos que presentan amplificación de EGFR, sin embargo, la pertenencia al grupo 1 resultó estar relacionada con supervivencia reducida de forma significativa en análisis multivariante, de modo que constituye un factor de mal pronóstico de forma independiente del resto de alteraciones moleculares y de características clínicas incluidas en el análisis.

Estos resultados sugieren que, la utilización de la expresión de microRNAs como marcadores moleculares no debe basarse en la expresión diferencial de un único microRNA, sino en una

firma molecular que defina cada tumor y pueda relacionarse con otras alteraciones moleculares, con el pronóstico del paciente y con su respuesta al tratamiento.

En esta línea, existen algunos estudios recientes que han mostrado diferentes perfiles de expresión de microRNAs en gliomas que se correlacionan con diferentes patrones de expresión génica y con determinadas características clínicas de los pacientes (Ciafre y col., 2005; Rao y col., 2010). Kim y col. analizaron los perfiles de expresión de 261 glioblastomas a partir de los datos del TCGA e identificaron 5 grupos genética y clínicamente distintos, cada uno relacionado con un tipo celular de precursor neural (Kim y col., 2011). El alto grado de correspondencia entre los grupos designados por el perfil de expresión de microRNAs y cada estadio de diferenciación de las células madre neurales, apoya la idea de que los glioblastomas pueden desarrollarse a partir de la transformación de precursores neurales en múltiples estadios de la diferenciación. Además, el hecho de que estos grupos presenten diferencias importantes en las alteraciones génicas, en las características clínicas (por ejemplo la raza, en función de la cual la incidencia de gliomas es muy diferente), en la supervivencia del paciente y en la respuesta al tratamiento, revela la importancia de la clasificación de gliomas, de forma que se permita un pronóstico más acertado y la posibilidad de desarrollar estrategias terapéuticas, basadas en el perfil molecular, que puedan mejorar la supervivencia del paciente.

En nuestro estudio hemos vislumbrado la existencia de 3 tipos diferenciados de glioma que se corresponden con determinadas características moleculares de los tumores y con la supervivencia de los pacientes. La comparación de nuestros grupos con los establecidos por otros autores resulta complicada debido, por una parte, a la diversidad de técnicas utilizadas para la determinación de la expresión de microRNAs (Ach y col., 2008; Aldridge & Hadfield, 2012; Chen y col., 2009; Git y col., 2010; Jensen y col., 2011; Jorgensen y col., 2010; Wang y col., 2009) y por otra parte a las diferencias en las series de tumores iniciales, principalmente en cuanto al grado. En nuestro caso, a diferencia de la serie analizada por Kim y col. que consta sólo de glioblastomas, la clasificación basada en la expresión de microRNAs incluye tumores de bajo grado, más difíciles de clasificar y que muestran diferencias importantes con los tumores de alto grado.

En cuanto al análisis conjunto de los datos de expresión de microRNAs, si bien en un principio habíamos considerado la posibilidad de que su utilización pudiera constituir una herramienta más manejable que el conjunto de datos de expresión génica para la clasificación molecular de los gliomas, el creciente número de microRNAs que se han ido describiendo a lo largo de la realización de este trabajo, sus múltiples dianas y el alto grado de complejidad de su propia regulación, ha hecho que resulte tanto o más complicado que hacer clasificaciones basadas en expresión génica. No obstante, su importancia en la regulación génica y el hecho de que estén frecuentemente alterados en cáncer los convierte en objetivo de estudio y de imprescindible integración en el análisis de las alteraciones génicas de los tumores.

La técnica que hemos utilizado para el análisis de la expresión de microRNAs ha demostrado ser muy sensible y específica, ya que ha permitido obtener magnitudes muy elevadas en el cambio de expresión de microRNAs entre diferentes grupos de muestras, lo que es sólo posible con técnicas de gran sensibilidad; además, el hecho de que determinados microRNAs no hayan mostrado expresión en ninguna de las muestras es prueba de la especificidad de la técnica, que no da lugar a contaminación cruzada ni ruido de fondo.

El algoritmo de decisión que hemos desarrollado para la adjudicación de grupo está basado principalmente en la expresión de miR-21, miR-9, miR-1 y miR-124 que no sólo muestran expresión diferencial característica de cada grupo sino que, además, tienen significación biológica y están implicados en procesos tumorales, lo que refuerza la importancia de su capacidad discriminativa.

Una de las limitaciones de nuestro estudio es el hecho de que la selección de pacientes está condicionada por la posibilidad de conseguir una muestra adecuada para los análisis moleculares; así, indirectamente, se está haciendo una preselección de aquellos que han podido ser sometidos a una resección lo suficientemente amplia, de modo que la totalidad de la población de pacientes con gliomas podría no estar fielmente representada.

Además, dado que nuestro estudio es retrospectivo, será conveniente plantear un estudio prospectivo que confirme estos resultados, principalmente la reproducibilidad de la asignación de grupo de expresión de microRNAs mediante el algoritmo que hemos desarrollado y el

efecto sobre la supervivencia de los pacientes de la pertenencia a cada grupo. Este será uno de los próximos objetivos de la continuación de este trabajo.

En conjunto, nuestros datos sugieren que algunos de los marcadores moleculares analizados podrían ser pronósticos o predictivos de respuesta a tratamiento, especialmente dentro de grupos establecidos en función de determinadas variables clínicas y que la expresión de microRNAs permite una nueva clasificación de los gliomas que muestra correlación con las variables moleculares analizadas y con la supervivencia de los pacientes; además, esta clasificación es posible mediante un algoritmo sencillo, basado en la expresión diferencial de unos pocos microRNAs con sentido biológico y demostrada implicación en procesos tumorales.

6. CONCLUSIONES

1. Los glioblastomas presentan patrones de alteraciones moleculares característicos, diferentes a los de los tumores de menor grado. Las alteraciones presentes en gliomas muestran correlaciones entre sí y con las características clínicas de los pacientes.
2. De las características clínicas y de las alteraciones moleculares analizadas en glioblastomas, la extensión de la resección, el tratamiento postquirúrgico, la amplificación de *EGFR* y la pérdida conjunta de *CDKN2A* y *PTEN* mostraron influencia significativa sobre la supervivencia de forma independiente, por lo que podrían constituir importantes factores pronósticos o predictivos de respuesta a terapia.
3. El estatus de metilación del promotor de *MGMT* no tuvo influencia como factor pronóstico en los pacientes con glioblastoma.
4. En los gliomas de grado III la edad, la presencia de mutaciones en *IDH1*, la metilación del promotor de *MGMT* y las pérdidas de *CDKN2A* y *PTEN* mostraron influencia sobre la supervivencia en el modelo univariante. Sin embargo, sólo la edad al diagnóstico resultó ser factor pronóstico de forma independiente, por lo que la importancia de algunas de estas alteraciones como factores pronósticos podría recaer en su correlación con la edad y con otras variables.
5. La expresión de microRNAs es suficiente para discernir, mediante un análisis no supervisado, muestras de tejido mamario y de tejido cerebral normal entre sí y de sus correspondientes tumores.
6. La mayoría de los microRNAs con expresión diferencial en tumores respecto al tejido normal muestran represión.

7. Se ha podido encontrar un perfil de expresión de 35 microRNAs que permiten distinguir tumores gliales de tejido cerebral normal.
8. Los patrones de expresión de microRNAs no se corresponden con las etiquetas histopatológicas que definen actualmente los gliomas.
9. Se han detectado tres grupos de gliomas mediante su perfil de expresión de microRNAs. Cada grupo presenta expresión diferencial de microRNAs característicos, algunos con demostrada importancia en el desarrollo y mantenimiento tumoral y en la diferenciación de tejido cerebral.
10. La clasificación de muestras tumorales en estos tres nuevos grupos puede realizarse de forma sencilla a partir de los datos de expresión de unos pocos microRNAs que definen cada grupo y de la presencia de mutación en *IDH1* a partir de un algoritmo de asignación que hemos desarrollado.
11. Los nuevos grupos tumorales, determinados por la expresión de microRNAs, muestran correlación con algunas de las variables moleculares analizadas y con la supervivencia de los pacientes.

7. BIBLIOGRAFÍA

Ach RA, Wang H, Curry B (2008) Measuring microRNAs: comparisons of microarray and quantitative PCR measurements, and of different total RNA prep methods. *BMC Biotechnol* **8**: 69

Aldridge S, Hadfield J (2012) Introduction to miRNA profiling technologies and cross-platform comparison. *Methods Mol Biol* **822**: 19-31

Bady P, Sciuscio D, Diserens AC, Bloch J, van den Bent MJ, Marosi C, Dietrich PY, Weller M, Mariani L, Heppner FL, McDonald DR, Lacombe D, Stupp R, Delorenzi M, Hegi ME (2012) MGMT methylation analysis of glioblastoma on the Infinium methylation BeadChip identifies two distinct CpG regions associated with gene silencing and outcome, yielding a prediction model for comparisons across datasets, tumor grades, and CIMP-status. *Acta Neuropathol* **124**(4): 547-60

Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**(2): 281-97

Batchelor TT, Betensky RA, Esposito JM, Pham LD, Dorfman MV, Piscatelli N, Jung S, Rhee D, Louis DN (2004) Age-dependent prognostic effects of genetic alterations in glioblastoma. *Clin Cancer Res* **10**(1 Pt 1): 228-33

Belda-Iniesta C, de Castro Carpeno J, Casado Saenz E, Cejas Guerrero P, Perona R, Gonzalez Baron M (2006) Molecular biology of malignant gliomas. *Clin Transl Oncol* **8**(9): 635-41

Benito R, Gil-Benso R, Quilis V, Perez M, Gregori-Romero M, Roldan P, Gonzalez-Darder J, Cerda-Nicolas M, Lopez-Gines C (2010) Primary glioblastomas with and without EGFR amplification: relationship to genetic alterations and clinicopathological features. *Neuropathology* **30**(4): 392-400

Bentwich I, Avniel A, Karov Y, Aharonov R, Gilad S, Barad O, Barzilai A, Einat P, Einav U, Meiri E, Sharon E, Spector Y, Bentwich Z (2005) Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet* **37**(7): 766-70

Brennan C, Momota H, Hambardzumyan D, Ozawa T, Tandon A, Pedraza A, Holland E (2009) Glioblastoma subclasses can be defined by activity among signal transduction pathways and associated genomic alterations. *PLoS One* **4**(11): e7752

Cairncross G, Jenkins R (2008) Gliomas with 1p/19q codeletion: a.k.a. oligodendroglioma. *Cancer J* **14**(6): 352-7

Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, Lisle DK, Finkelstein DM, Hammond RR, Silver JS, Stark PC, Macdonald DR, Ino Y, Ramsay DA, Louis DN (1998) Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst* **90**(19): 1473-9

Calin GA, Croce CM (2006) MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* **6**(11): 857-66

Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM (2004) Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(9): 2999-3004

Cancer Genome Atlas Research N (2008) Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* **455**(7216): 1061-8

- Carico C, Nuno M, Mukherjee D, Elramsisy A, Dantis J, Hu J, Rudnick J, Yu JS, Black KL, Bannykh SI, Patil CG (2012) Loss of PTEN is not associated with poor survival in newly diagnosed glioblastoma patients of the temozolomide era. *PLoS One* **7**(3): e33684
- Carro MS, Lim WK, Alvarez MJ, Bollo RJ, Zhao X, Snyder EY, Sulman EP, Anne SL, Doetsch F, Colman H, Lasorella A, Aldape K, Califano A, Iavarone A (2010) The transcriptional network for mesenchymal transformation of brain tumours. *Nature* **463**(7279): 318-25
- Ciafre SA, Galardi S, Mangiola A, Ferracin M, Liu CG, Sabatino G, Negrini M, Maira G, Croce CM, Farace MG (2005) Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun* **334**(4): 1351-8
- Combs SE, Rieken S, Wick W, Abdollahi A, von Deimling A, Debus J, Hartmann C (2011) Prognostic significance of IDH-1 and MGMT in patients with glioblastoma: one step forward, and one step back? *Radiat Oncol* **6**: 115
- Conti A, Aguenouz M, La Torre D, Tomasello C, Cardali S, Angileri FF, Maio F, Cama A, Germano A, Vita G, Tomasello F (2009) miR-21 and 221 upregulation and miR-181b downregulation in human grade II-IV astrocytic tumors. *J Neurooncol* **93**(3): 325-32
- Corsten MF, Miranda R, Kasmieh R, Krichevsky AM, Weissleder R, Shah K (2007) MicroRNA-21 knockdown disrupts glioma growth in vivo and displays synergistic cytotoxicity with neural precursor cell delivered S-TRAIL in human gliomas. *Cancer Res* **67**(19): 8994-9000
- Costa BM, Caeiro C, Guimaraes I, Martinho O, Jaraquemada T, Augusto I, Castro L, Osorio L, Linhares P, Honavar M, Resende M, Braga F, Silva A, Pardal F, Amorim J, Nabico R, Almeida R, Alegria C, Pires M, Pinheiro C, Carvalho E, Lopes JM, Costa P, Damasceno M, Reis RM (2010) Prognostic value of MGMT promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide-based chemoradiation: a Portuguese multicentre study. *Oncol Rep* **23**(6): 1655-62
- Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS (2005) MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res* **65**(14): 6029-33
- Chang C, Shi H, Wang C, Wang J, Geng N, Jiang X, Wang X (2012) Correlation of microRNA-375 downregulation with unfavorable clinical outcome of patients with glioma. *Neurosci Lett* **531**(2): 204-8
- Chen L, Zhang J, Feng Y, Li R, Sun X, Du W, Piao X, Wang H, Yang D, Sun Y, Li X, Jiang T, Kang C, Li Y, Jiang C (2012) MiR-410 regulates MET to influence the proliferation and invasion of glioma. *Int J Biochem Cell Biol* **44**(11): 1711-7
- Chen R, Nishimura MC, Bumbaca SM, Kharbanda S, Forrest WF, Kasman IM, Greve JM, Soriano RH, Gilmour LL, Rivers CS, Modrusan Z, Nacu S, Guerrero S, Edgar KA, Wallin JJ, Lamszus K, Westphal M, Heim S, James CD, VandenBerg SR, Costello JF, Moorefield S, Cowdrey CJ, Prados M, Phillips HS (2010) A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma. *Cancer Cell* **17**(4): 362-75
- Chen Y, Gelfond JA, McManus LM, Shireman PK (2009) Reproducibility of quantitative RT-PCR array in miRNA expression profiling and comparison with microarray analysis. *BMC Genomics* **10**: 407
- Chen Y, Liu W, Chao T, Zhang Y, Yan X, Gong Y, Qiang B, Yuan J, Sun M, Peng X (2008) MicroRNA-21 down-regulates the expression of tumor suppressor PDCD4 in human glioblastoma cell T98G. *Cancer Lett* **272**(2): 197-205

- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**(1): 156-9
- Christians A, Hartmann C, Benner A, Meyer J, von Deimling A, Weller M, Wick W, Weiler M (2012) Prognostic value of three different methods of MGMT promoter methylation analysis in a prospective trial on newly diagnosed glioblastoma. *PLoS One* **7**(3): e33449
- Dmitriev P, Barat A, Polesskaya A, O'Connell MJ, Robert T, Dessen P, Walsh TA, Lazar V, Turki A, Carnac G, Laoudj-Chenivesse D, Lipinski M, Vassetzky YS (2013) Simultaneous miRNA and mRNA transcriptome profiling of human myoblasts reveals a novel set of myogenic differentiation-associated miRNAs and their target genes. *BMC Genomics* **14**: 265
- Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C (2012) CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro Oncol* **14 Suppl 5**: v1-49
- Dunn J, Baborie A, Alam F, Joyce K, Moxham M, Sibson R, Crooks D, Husband D, Shenoy A, Brodbelt A, Wong H, Liloglou T, Haylock B, Walker C (2009) Extent of MGMT promoter methylation correlates with outcome in glioblastomas given temozolomide and radiotherapy. *Br J Cancer* **101**(1): 124-31
- Ermoian RP, Furniss CS, Lamborn KR, Basila D, Berger MS, Gottschalk AR, Nicholas MK, Stokoe D, Haas-Kogan DA (2002) Dysregulation of PTEN and protein kinase B is associated with glioma histology and patient survival. *Clin Cancer Res* **8**(5): 1100-6
- Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, Herman JG (2000) Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* **343**(19): 1350-4
- Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG (1999) Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res* **59**(4): 793-7
- Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E (2008) Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* **132**(1): 9-14
- Eyupoglu IY, Buchfelder M, Savaskan NE (2013) Surgical resection of malignant gliomas-role in optimizing patient outcome. *Nat Rev Neurol* **9**(3): 141-51
- Felsberg J, Rapp M, Loeser S, Fimmers R, Stummer W, Goepfert M, Steiger HJ, Friedensdorf B, Reifenberger G, Sabel MC (2009) Prognostic significance of molecular markers and extent of resection in primary glioblastoma patients. *Clin Cancer Res* **15**(21): 6683-93
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**(6669): 806-11
- Fowler A, Thomson D, Giles K, Maleki S, Mreich E, Wheeler H, Leedman P, Biggs M, Cook R, Little N, Robinson B, McDonald K (2011) miR-124a is frequently down-regulated in glioblastoma and is involved in migration and invasion. *Eur J Cancer* **47**(6): 953-63
- Freije WA, Castro-Vargas FE, Fang Z, Horvath S, Cloughesy T, Liao LM, Mischel PS, Nelson SF (2004) Gene expression profiling of gliomas strongly predicts survival. *Cancer Res* **64**(18): 6503-10

- Gabriely G, Wurdinger T, Kesari S, Esau CC, Burchard J, Linsley PS, Krichevsky AM (2008) MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators. *Mol Cell Biol* **28**(17): 5369-80
- Gabriely G, Yi M, Narayan RS, Niers JM, Wurdinger T, Imitola J, Ligon KL, Kesari S, Esau C, Stephens RM, Tannous BA, Krichevsky AM (2011) Human glioma growth is controlled by microRNA-10b. *Cancer Res* **71**(10): 3563-72
- Gaedcke J, Grade M, Camps J, Sokilde R, Kaczkowski B, Schetter AJ, Difilippantonio MJ, Harris CC, Ghadimi BM, Moller S, Beissbarth T, Ried T, Litman T (2012) The rectal cancer microRNAome--microRNA expression in rectal cancer and matched normal mucosa. *Clin Cancer Res* **18**(18): 4919-30
- Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, Fiocco R, Foroni C, Dimeco F, Vescovi A (2004) Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res* **64**(19): 7011-21
- Gaur A, Jewell DA, Liang Y, Ridzon D, Moore JH, Chen C, Ambros VR, Israel MA (2007) Characterization of microRNA expression levels and their biological correlates in human cancer cell lines. *Cancer Res* **67**(6): 2456-68
- Git A, Dvinge H, Salmon-Divon M, Osborne M, Kutter C, Hadfield J, Bertone P, Caldas C (2010) Systematic comparison of microarray profiling, real-time PCR, and next-generation sequencing technologies for measuring differential microRNA expression. *RNA* **16**(5): 991-1006
- Godlewski J, Nowicki MO, Bronisz A, Nuovo G, Palatini J, De Lay M, Van Brocklyn J, Ostrowski MC, Chiocca EA, Lawler SE (2010) MicroRNA-451 regulates LKB1/AMPK signaling and allows adaptation to metabolic stress in glioma cells. *Mol Cell* **37**(5): 620-32
- Gregory RI, Chendrimada TP, Shiekhattar R (2006) MicroRNA biogenesis: isolation and characterization of the microprocessor complex. *Methods Mol Biol* **342**: 33-47
- Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ (2006) miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* **34**(Database issue): D140-4
- Guan Y, Mizoguchi M, Yoshimoto K, Hata N, Shono T, Suzuki SO, Araki Y, Kuga D, Nakamizo A, Amano T, Ma X, Hayashi K, Sasaki T (2010) MiRNA-196 is upregulated in glioblastoma but not in anaplastic astrocytoma and has prognostic significance. *Clin Cancer Res* **16**(16): 4289-97
- Gupta K, Salunke P (2012) Molecular markers of glioma: an update on recent progress and perspectives. *J Cancer Res Clin Oncol* **138**(12): 1971-81
- Haapa-Paananen S, Chen P, Hellstrom K, Kohonen P, Hautaniemi S, Kallioniemi O, Perala M (2013) Functional profiling of precursor MicroRNAs identifies MicroRNAs essential for glioma proliferation. *PLoS One* **8**(4): e60930
- Hartmann C, Hentschel B, Tatagiba M, Schramm J, Schnell O, Seidel C, Stein R, Reifenberger G, Pietsch T, von Deimling A, Loeffler M, Weller M, German Glioma N (2011) Molecular markers in low-grade gliomas: predictive or prognostic? *Clin Cancer Res* **17**(13): 4588-99
- Hartmann C, Hentschel B, Wick W, Capper D, Felsberg J, Simon M, Westphal M, Schackert G, Meyermann R, Pietsch T, Reifenberger G, Weller M, Loeffler M, von Deimling A (2010) Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas. *Acta Neuropathol* **120**(6): 707-18

- He Z, Cen D, Luo X, Li D, Li P, Liang L, Meng Z (2013) Downregulation of miR-383 promotes glioma cell invasion by targeting insulin-like growth factor 1 receptor. *Med Oncol* **30**(2): 557
- Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R (2005) MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* **352**(10): 997-1003
- Henson JW, Ulmer S, Harris GJ (2008) Brain tumor imaging in clinical trials. *AJNR Am J Neuroradiol* **29**(3): 419-24
- Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB (1996) Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(18): 9821-6
- Hobbs J, Nikiforova MN, Fardo DW, Bortoluzzi S, Cieply K, Hamilton RL, Horbinski C (2012) Paradoxical relationship between the degree of EGFR amplification and outcome in glioblastomas. *Am J Surg Pathol* **36**(8): 1186-93
- Houillier C, Lejeune J, Benouaich-Amiel A, Laigle-Donadey F, Criniere E, Mokhtari K, Thillet J, Delattre JY, Hoang-Xuan K, Sanson M (2006) Prognostic impact of molecular markers in a series of 220 primary glioblastomas. *Cancer* **106**(10): 2218-23
- Hua D, Ding D, Han X, Zhang W, Zhao N, Foltz G, Lan Q, Huang Q, Lin B (2012) Human miR-31 targets radixin and inhibits migration and invasion of glioma cells. *Oncol Rep* **27**(3): 700-6
- Huncharek M, Kupelnick B (2000) Epidermal growth factor receptor gene amplification as a prognostic marker in glioblastoma multiforme: results of a meta-analysis. *Oncol Res* **12**(2): 107-12
- Huse JT, Phillips HS, Brennan CW (2011) Molecular subclassification of diffuse gliomas: seeing order in the chaos. *Glia* **59**(8): 1190-9
- Idoate MA, Echeveste J (2007) [Update on the molecular biology of gliomas: towards a pathomolecular classification of gliomas]. *Rev Neurol* **44**(4): 217-24
- Iliadis G, Kotoula V, Chatzistotiriou A, Televantou D, Eleftheraki AG, Lambaki S, Misailidou D, Selviaridis P, Fountzilias G (2012) Volumetric and MGMT parameters in glioblastoma patients: survival analysis. *BMC Cancer* **12**: 3
- Jackson EL, Garcia-Verdugo JM, Gil-Perotin S, Roy M, Quinones-Hinojosa A, VandenBerg S, Alvarez-Buylla A (2006) PDGFR alpha-positive B cells are neural stem cells in the adult SVZ that form glioma-like growths in response to increased PDGF signaling. *Neuron* **51**(2): 187-99
- Jenkins RB, Blair H, Ballman KV, Giannini C, Arusell RM, Law M, Flynn H, Passe S, Felten S, Brown PD, Shaw EG, Buckner JC (2006) A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma. *Cancer Res* **66**(20): 9852-61
- Jensen SG, Lamy P, Rasmussen MH, Ostenfeld MS, Dyrskjot L, Orntoft TF, Andersen CL (2011) Evaluation of two commercial global miRNA expression profiling platforms for detection of less abundant miRNAs. *BMC Genomics* **12**: 435
- Jeuken J, Cornelissen S, Boots-Sprenger S, Gijzen S, Wesseling P (2006) Multiplex ligation-dependent probe amplification: a diagnostic tool for simultaneous identification of different genetic markers in glial tumors. *J Mol Diagn* **8**(4): 433-43

- Jiang H, Ren X, Zhang W, Ma J, Sui D, Jiang Z, Cui X, Lin S (2013) A new prognostic scoring scale for patients with primary WHO grade III gliomas based on molecular predictors. *J Neurooncol* **111**(3): 367-75
- Jiang L, Mao P, Song L, Wu J, Huang J, Lin C, Yuan J, Qu L, Cheng SY, Li J (2010) miR-182 as a prognostic marker for glioma progression and patient survival. *Am J Pathol* **177**(1): 29-38
- Jones TS, Holland EC (2011) Molecular pathogenesis of malignant glial tumors. *Toxicol Pathol* **39**(1): 158-66
- Jorgensen S, Baker A, Moller S, Nielsen BS (2010) Robust one-day in situ hybridization protocol for detection of microRNAs in paraffin samples using LNA probes. *Methods* **52**(4): 375-81
- Kapoor GS, Christie A, O'Rourke DM (2007) EGFR inhibition in glioblastoma cells induces G2/M arrest and is independent of p53. *Cancer Biol Ther* **6**(4): 571-9
- Karayan-Tapon L, Quillien V, Guilhot J, Wager M, Fromont G, Saikali S, Etcheverry A, Hamlat A, Lousouarn D, Campion L, Campone M, Vallette FM, Gratas-Rabbia-Re C (2010) Prognostic value of O6-methylguanine-DNA methyltransferase status in glioblastoma patients, assessed by five different methods. *J Neurooncol* **97**(3): 311-22
- Karpel-Massler G, Schmidt U, Unterberg A, Halatsch ME (2009) Therapeutic inhibition of the epidermal growth factor receptor in high-grade gliomas: where do we stand? *Mol Cancer Res* **7**(7): 1000-12
- Karsy M, Arslan E, Moy F (2012) Current Progress on Understanding MicroRNAs in Glioblastoma Multiforme. *Genes Cancer* **3**(1): 3-15
- Kesari S, Stiles CD (2006) The bad seed: PDGF receptors link adult neural progenitors to glioma stem cells. *Neuron* **51**(2): 151-3
- Kim TM, Huang W, Park R, Park PJ, Johnson MD (2011) A developmental taxonomy of glioblastoma defined and maintained by MicroRNAs. *Cancer Res* **71**(9): 3387-99
- Kim YH, Nobusawa S, Mittelbronn M, Paulus W, Brokinkel B, Keyvani K, Sure U, Wrede K, Nakazato Y, Tanaka Y, Vital A, Mariani L, Stawski R, Watanabe T, De Girolami U, Kleihues P, Ohgaki H (2010) Molecular classification of low-grade diffuse gliomas. *Am J Pathol* **177**(6): 2708-14
- Kita D, Yonekawa Y, Weller M, Ohgaki H (2007) PIK3CA alterations in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol* **113**(3): 295-302
- Konglund A, Helseth R, Lund-Johansen M, Helseth E, Meling TR (2013) Surgery for high-grade gliomas in the aging. *Acta Neurol Scand*
- Labussiere M, Idbaih A, Wang XW, Marie Y, Boisselier B, Falet C, Paris S, Laffaire J, Carpentier C, Criniere E, Ducray F, El Hallani S, Mokhtari K, Hoang-Xuan K, Delattre JY, Sanson M (2010) All the 1p19q codeleted gliomas are mutated on IDH1 or IDH2. *Neurology* **74**(23): 1886-90
- Laddha SV, Nayak S, Paul D, Reddy R, Sharma C, Jha P, Hariharan M, Agrawal A, Chowdhury S, Sarkar C, Mukhopadhyay A (2013) Genome-wide analysis reveals downregulation of miR-379/miR-656 cluster in human cancers. *Biol Direct* **8**(1): 10
- Lai A, Kharbanda S, Pope WB, Tran A, Solis OE, Peale F, Forrest WF, Pujara K, Carrillo JA, Pandita A, Ellingson BM, Bowers CW, Soriano RH, Schmidt NO, Mohan S, Yong WH, Seshagiri S, Modrusan Z, Jiang Z, Aldape KD, Mischel PS, Liau LM, Escovedo CJ, Chen W, Nghiemphu PL, James CD,

- Prados MD, Westphal M, Lamszus K, Cloughesy T, Phillips HS (2011) Evidence for sequenced molecular evolution of IDH1 mutant glioblastoma from a distinct cell of origin. *J Clin Oncol* **29**(34): 4482-90
- Lakomy R, Sana J, Hankeova S, Fadrus P, Kren L, Lzicarova E, Svoboda M, Dolezelova H, Smrcka M, Vyzula R, Michalek J, Hajduch M, Slaby O (2011) MiR-195, miR-196b, miR-181c, miR-21 expression levels and O-6-methylguanine-DNA methyltransferase methylation status are associated with clinical outcome in glioblastoma patients. *Cancer Sci* **102**(12): 2186-90
- Lalezari S, Chou AP, Tran A, Solis OE, Khanlou N, Chen W, Li S, Carrillo JA, Chowdhury R, Selfridge J, Sanchez DE, Wilson RW, Zurayk M, Lalezari J, Lou JJ, Ormiston L, Ancheta K, Hanna R, Miller P, Piccioni D, Ellingson BM, Buchanan C, Mischel PS, Nghiemphu PL, Green R, Wang HJ, Pope WB, Liao LM, Elashoff RM, Cloughesy TF, Yong WH, Lai A (2013) Combined analysis of O6-methylguanine-DNA methyltransferase protein expression and promoter methylation provides optimized prognostication of glioblastoma outcome. *Neuro Oncol* **15**(3): 370-81
- Lavon I, Zrihan D, Granit A, Einstein O, Fainstein N, Cohen MA, Cohen MA, Zelikovitch B, Shoshan Y, Spektor S, Reubinoff BE, Felig Y, Gerlitz O, Ben-Hur T, Smith Y, Siegal T (2010) Gliomas display a microRNA expression profile reminiscent of neural precursor cells. *Neuro Oncol* **12**(5): 422-33
- Layfield LJ, Willmore C, Tripp S, Jones C, Jensen RL (2006) Epidermal growth factor receptor gene amplification and protein expression in glioblastoma multiforme: prognostic significance and relationship to other prognostic factors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **14**(1): 91-6
- Lee KH, Chen YL, Yeh SD, Hsiao M, Lin JT, Goan YG, Lu PJ (2009) MicroRNA-330 acts as tumor suppressor and induces apoptosis of prostate cancer cells through E2F1-mediated suppression of Akt phosphorylation. *Oncogene* **28**(38): 3360-70
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**(5): 843-54
- Lee ST, Chu K, Oh HJ, Im WS, Lim JY, Kim SK, Park CK, Jung KH, Lee SK, Kim M, Roh JK (2011) Let-7 microRNA inhibits the proliferation of human glioblastoma cells. *J Neurooncol* **102**(1): 19-24
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**(6956): 415-9
- Levin VA, Silver P, Hannigan J, Wara WM, Gutin PH, Davis RL, Wilson CB (1990) Superiority of post-radiotherapy adjuvant chemotherapy with CCNU, procarbazine, and vincristine (PCV) over BCNU for anaplastic gliomas: NCOG 6G61 final report. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **18**(2): 321-4
- Li D, Yang P, Li H, Cheng P, Zhang L, Wei D, Su X, Peng J, Gao H, Tan Y, Zhao Z, Li Y, Qi Z, Rui Y, Zhang T (2012) MicroRNA-1 inhibits proliferation of hepatocarcinoma cells by targeting endothelin-1. *Life Sci* **91**(11-12): 440-7
- Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliaresis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Iltmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R (1997) PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* **275**(5308): 1943-7
- Li Y, Zhu X, Xu W, Wang D, Yan J (2013) miR-330 regulates the proliferation of colorectal cancer cells by targeting Cdc42. *Biochem Biophys Res Commun* **431**(3): 560-5

- Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, Parker R (2005a) MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol* **7**(7): 719-23
- Liu L, Backlund LM, Nilsson BR, Grander D, Ichimura K, Goike HM, Collins VP (2005b) Clinical significance of EGFR amplification and the aberrant EGFRvIII transcript in conventionally treated astrocytic gliomas. *J Mol Med (Berl)* **83**(11): 917-26
- Liu W, Lv G, Li Y, Li L, Wang B (2011) Downregulation of CDKN2A and suppression of cyclin D1 gene expressions in malignant gliomas. *J Exp Clin Cancer Res* **30**: 76
- Lo HW (2010) EGFR-targeted therapy in malignant glioma: novel aspects and mechanisms of drug resistance. *Curr Mol Pharmacol* **3**(1): 37-52
- Louis DN (1994) The p53 gene and protein in human brain tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* **53**(1): 11-21
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* **114**(2): 97-109
- Lu C, Ward PS, Kapoor GS, Rohle D, Turcan S, Abdel-Wahab O, Edwards CR, Khanin R, Figueroa ME, Melnick A, Wellen KE, O'Rourke DM, Berger SL, Chan TA, Levine RL, Mellinghoff IK, Thompson CB (2012) IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature* **483**(7390): 474-8
- Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* **435**(7043): 834-8
- Lu M, Shi B, Wang J, Cao Q, Cui Q (2010) TAM: a method for enrichment and depletion analysis of a microRNA category in a list of microRNAs. *BMC Bioinformatics* **11**: 419
- Lujambio A, Ropero S, Ballestar E, Fraga MF, Cerrato C, Setien F, Casado S, Suarez-Gauthier A, Sanchez-Cespedes M, Git A, Spiteri I, Das PP, Caldas C, Miska E, Esteller M (2007) Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res* **67**(4): 1424-9
- Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U (2004) Nuclear export of microRNA precursors. *Science* **303**(5654): 95-8
- Luo D, Wilson JM, Harvel N, Liu J, Pei L, Huang S, Hawthorn L, Shi H (2013) A systematic evaluation of miRNA:mRNA interactions involved in the migration and invasion of breast cancer cells. *J Transl Med* **11**: 57
- Ma R, Zhang G, Wang H, Lv H, Fang F, Kang X (2012) Downregulation of miR-544 in tissue, but not in serum, is a novel biomarker of malignant transformation in glioma. *Oncol Lett* **4**(6): 1321-1324
- Malzkorn B, Wolter M, Liesenberg F, Grzendowski M, Stuhler K, Meyer HE, Reifenberger G (2010) Identification and functional characterization of microRNAs involved in the malignant progression of gliomas. *Brain Pathol* **20**(3): 539-50
- Mao Y, Chen H, Lin Y, Xu X, Hu Z, Zhu Y, Wu J, Xu X, Zheng X, Xie L (2013) microRNA-330 inhibits cell motility by downregulating Sp1 in prostate cancer cells. *Oncol Rep* **30**(1): 327-33

- McDonald JM, See SJ, Tremont IW, Colman H, Gilbert MR, Groves M, Burger PC, Louis DN, Giannini C, Fuller G, Passe S, Blair H, Jenkins RB, Yang H, Ledoux A, Aaron J, Tiptis U, Zhang W, Hess K, Aldape K (2005) The prognostic impact of histology and 1p/19q status in anaplastic oligodendroglial tumors. *Cancer* **104**(7): 1468-77
- McEllin B, Camacho CV, Mukherjee B, Hahm B, Tomimatsu N, Bachoo RM, Burma S (2010) PTEN loss compromises homologous recombination repair in astrocytes: implications for glioblastoma therapy with temozolomide or poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Cancer Res* **70**(13): 5457-64
- Medina I, Montaner D, Tarraga J, Dopazo J (2007) Prophet, a web-based tool for class prediction using microarray data. *Bioinformatics* **23**(3): 390-1
- Mellinghoff IK, Wang MY, Vivanco I, Haas-Kogan DA, Zhu S, Dia EQ, Lu KV, Yoshimoto K, Huang JH, Chute DJ, Riggs BL, Horvath S, Liau LM, Cavenee WK, Rao PN, Beroukhir R, Peck TC, Lee JC, Sellers WR, Stokoe D, Prados M, Cloughesy TF, Sawyers CL, Mischel PS (2005) Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *N Engl J Med* **353**(19): 2012-24
- Metellus P, Coulibaly B, Colin C, de Paula AM, Vasiljevic A, Taieb D, Barlier A, Boisselier B, Mokhtari K, Wang XW, Loundou A, Chapon F, Pineau S, Ouafik L, Chinot O, Figarella-Branger D (2010) Absence of IDH mutation identifies a novel radiologic and molecular subtype of WHO grade II gliomas with dismal prognosis. *Acta Neuropathol* **120**(6): 719-29
- Montano N, Cenci T, Martini M, D'Alessandris QG, Pelacchi F, Ricci-Vitiani L, Maira G, De Maria R, Larocca LM, Pallini R (2011) Expression of EGFRvIII in glioblastoma: prognostic significance revisited. *Neoplasia* **13**(12): 1113-21
- Nan Y, Han L, Zhang A, Wang G, Jia Z, Yang Y, Yue X, Pu P, Zhong Y, Kang C (2010) MiRNA-451 plays a role as tumor suppressor in human glioma cells. *Brain Res* **1359**: 14-21
- Nazarenko I, Hede SM, He X, Hedren A, Thompson J, Lindstrom MS, Nister M (2012) PDGF and PDGF receptors in glioma. *Ups J Med Sci* **117**(2): 99-112
- Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, Phillips HS, Pujara K, Berman BP, Pan F, Pelloski CE, Sulman EP, Bhat KP, Verhaak RG, Hoadley KA, Hayes DN, Perou CM, Schmidt HK, Ding L, Wilson RK, Van Den Berg D, Shen H, Bengtsson H, Neuvial P, Cope LM, Buckley J, Herman JG, Baylin SB, Laird PW, Aldape K (2010) Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell* **17**(5): 510-22
- Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, Phillips HS, Pujara K, Berman BP, Pan F, Pelloski CE, Sulman EP, Bhat KP, Verhaak RG, Hoadley KA, Hayes DN, Perou CM, Schmidt HK, Ding L, Wilson RK, Van Den Berg D, Shen H, Bengtsson H, Neuvial P, Cope LM, Buckley J, Herman JG, Baylin SB, Laird PW, Aldape K, Cancer Genome Atlas Research N (2010) Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell* **17**(5): 510-22
- Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, Burkhard C, Schuler D, Probst-Hensch NM, Maiorka PC, Baeza N, Pisani P, Yonekawa Y, Yasargil MG, Lutolf UM, Kleihues P (2004) Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* **64**(19): 6892-9
- Ohgaki H, Kleihues P (2005) Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol* **109**(1): 93-108
- Ohgaki H, Kleihues P (2007) Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* **170**(5): 1445-53

- Ohgaki H, Kleihues P (2013) The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res* **19**(4): 764-72
- Ozawa T, Brennan CW, Wang L, Squatrito M, Sasayama T, Nakada M, Huse JT, Pedraza A, Utsuki S, Yasui Y, Tandon A, Fomchenko EI, Oka H, Levine RL, Fujii K, Ladanyi M, Holland EC (2010) PDGFRA gene rearrangements are frequent genetic events in PDGFRA-amplified glioblastomas. *Genes Dev* **24**(19): 2205-18
- Pan SJ, Zhan SK, Pei BG, Sun QF, Bian LG, Sun BM (2012) MicroRNA-149 inhibits proliferation and invasion of glioma cells via blockade of AKT1 signaling. *Int J Immunopathol Pharmacol* **25**(4): 871-81
- Papagiannakopoulos T, Shapiro A, Kosik KS (2008) MicroRNA-21 targets a network of key tumor-suppressive pathways in glioblastoma cells. *Cancer Res* **68**(19): 8164-72
- Park CK, Park SH, Lee SH, Kim CY, Kim DW, Paek SH, Kim DG, Heo DS, Kim IH, Jung HW (2009) Methylation status of the MGMT gene promoter fails to predict the clinical outcome of glioblastoma patients treated with ACNU plus cisplatin. *Neuropathology* **29**(4): 443-9
- Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, Diaz LA, Jr., Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie SK, Shinjo SM, Yan H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW (2008) An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* **321**(5897): 1807-12
- Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrester WF, Soriano RH, Wu TD, Misra A, Nigro JM, Colman H, Soroceanu L, Williams PM, Modrusan Z, Feuerstein BG, Aldape K (2006) Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* **9**(3): 157-73
- Pope WB, Chen JH, Dong J, Carlson MR, Perlina A, Cloughesy TF, Liau LM, Mischel PS, Nghiemphu P, Lai A, Nelson SF (2008) Relationship between gene expression and enhancement in glioblastoma multiforme: exploratory DNA microarray analysis. *Radiology* **249**(1): 268-77
- Prados MD, Chang SM, Butowski N, DeBoer R, Parvataneni R, Carliner H, Kabuubi P, Ayers-Ringler J, Rabbitt J, Page M, Fedoroff A, Sneed PK, Berger MS, McDermott MW, Parsa AT, Vandenberg S, James CD, Lamborn KR, Stokoe D, Haas-Kogan DA (2009) Phase II study of erlotinib plus temozolomide during and after radiation therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme or gliosarcoma. *J Clin Oncol* **27**(4): 579-84
- Qu S, Yao Y, Shang C, Xue Y, Ma J, Li Z, Liu Y (2012) MicroRNA-330 is an oncogenic factor in glioblastoma cells by regulating SH3GL2 gene. *PLoS One* **7**(9): e46010
- Quackenbush J (2001) Computational analysis of microarray data. *Nat Rev Genet* **2**(6): 418-27
- Rao SA, Santosh V, Somasundaram K (2010) Genome-wide expression profiling identifies deregulated miRNAs in malignant astrocytoma. *Mod Pathol* **23**(10): 1404-17
- Reardon DA, Desjardins A, Vredenburgh JJ, Gururangan S, Friedman AH, Herndon JE, 2nd, Marcello J, Norfleet JA, McLendon RE, Sampson JH, Friedman HS (2010) Phase 2 trial of erlotinib plus sirolimus in adults with recurrent glioblastoma. *J Neurooncol* **96**(2): 219-30
- Ren Y, Zhou X, Mei M, Yuan XB, Han L, Wang GX, Jia ZF, Xu P, Pu PY, Kang CS (2010) MicroRNA-21 inhibitor sensitizes human glioblastoma cells U251 (PTEN-mutant) and LN229 (PTEN-wild type) to taxol. *BMC Cancer* **10**: 27

- Rich JN, Bigner DD (2004) Development of novel targeted therapies in the treatment of malignant glioma. *Nat Rev Drug Discov* **3**(5): 430-46
- Rivera AL, Pelloski CE, Gilbert MR, Colman H, De La Cruz C, Sulman EP, Bekele BN, Aldape KD (2010) MGMT promoter methylation is predictive of response to radiotherapy and prognostic in the absence of adjuvant alkylating chemotherapy for glioblastoma. *Neuro Oncol* **12**(2): 116-21
- Rohle D, Popovici-Muller J, Palaskas N, Turcan S, Grommes C, Campos C, Tsoi J, Clark O, Oldrini B, Komisopoulou E, Kunii K, Pedraza A, Schalm S, Silverman L, Miller A, Wang F, Yang H, Chen Y, Kernytsky A, Rosenblum MK, Liu W, Biller SA, Su SM, Brennan CW, Chan TA, Graeber TG, Yen KE, Mellinghoff IK (2013) An Inhibitor of Mutant IDH1 Delays Growth and Promotes Differentiation of Glioma Cells. *Science*
- Roth P, Wischhusen J, Happold C, Chandran PA, Hofer S, Eisele G, Weller M, Keller A (2011) A specific miRNA signature in the peripheral blood of glioblastoma patients. *J Neurochem* **118**(3): 449-57
- Sanai N, Berger MS (2008) Glioma extent of resection and its impact on patient outcome. *Neurosurgery* **62**(4): 753-64; discussion 264-6
- Sand M, Skrygan M, Sand D, Georgas D, Hahn SA, Gambichler T, Altmeyer P, Bechara FG (2012) Expression of microRNAs in basal cell carcinoma. *Br J Dermatol* **167**(4): 847-55
- Sanson M, Marie Y, Paris S, Idbaih A, Laffaire J, Ducray F, El Hallani S, Boisselier B, Mokhtari K, Hoang-Xuan K, Delattre JY (2009) Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *J Clin Oncol* **27**(25): 4150-4
- Sasaki H, Zlatescu MC, Betensky RA, Ino Y, Cairncross JG, Louis DN (2001) PTEN is a target of chromosome 10q loss in anaplastic oligodendrogliomas and PTEN alterations are associated with poor prognosis. *Am J Pathol* **159**(1): 359-67
- Sasayama T, Nishihara M, Kondoh T, Hosoda K, Kohmura E (2009) MicroRNA-10b is overexpressed in malignant glioma and associated with tumor invasive factors, uPAR and RhoC. *Int J Cancer* **125**(6): 1407-13
- Schwabe RF, Wang TC (2011) Targeting liver cancer: first steps toward a miRacle? *Cancer Cell* **20**(6): 698-9
- Shi L, Cheng Z, Zhang J, Li R, Zhao P, Fu Z, You Y (2008) hsa-mir-181a and hsa-mir-181b function as tumor suppressors in human glioma cells. *Brain Res* **1236**: 185-93
- Shinojima N, Tada K, Shiraishi S, Kamiryo T, Kochi M, Nakamura H, Makino K, Saya H, Hirano H, Kuratsu J, Oka K, Ishimaru Y, Ushio Y (2003) Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer Res* **63**(20): 6962-70
- Skalsky RL, Cullen BR (2011) Reduced expression of brain-enriched microRNAs in glioblastomas permits targeted regulation of a cell death gene. *PLoS One* **6**(9): e24248
- Slaby O, Lakomy R, Fadrus P, Hrstka R, Kren L, Lzicarova E, Smrcka M, Svoboda M, Dolezalova H, Novakova J, Valik D, Vyzula R, Michalek J (2010) MicroRNA-181 family predicts response to concomitant chemoradiotherapy with temozolomide in glioblastoma patients. *Neoplasia* **57**(3): 264-9
- Smith JS, Tachibana I, Passe SM, Huntley BK, Borell TJ, Iturria N, O'Fallon JR, Schaefer PL, Scheithauer BW, James CD, Buckner JC, Jenkins RB (2001) PTEN mutation, EGFR amplification, and

outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. *J Natl Cancer Inst* **93**(16): 1246-56

Smits M, Nilsson J, Mir SE, van der Stoop PM, Hulleman E, Niers JM, de Witt Hamer PC, Marquez VE, Cloos J, Krichevsky AM, Noske DP, Tannous BA, Wurdinger T (2010) miR-101 is down-regulated in glioblastoma resulting in EZH2-induced proliferation, migration, and angiogenesis. *Oncotarget* **1**(8): 710-20

Sottoriva A, Spiteri I, Piccirillo SG, Touloumis A, Collins VP, Marioni JC, Curtis C, Watts C, Tavaré S (2013) Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(10): 4009-14

Srivastava S, Zou ZQ, Pirolo K, Blattner W, Chang EH (1990) Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. *Nature* **348**(6303): 747-9

Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes AA, Gijtenbeek J, Marosi C, Vecht CJ, Mokhtari K, Wesseling P, Villa S, Eisenhauer E, Gorlia T, Weller M, Lacombe D, Cairncross JG, Mirimanoff RO, European Organisation for R, Treatment of Cancer Brain T, Radiation Oncology G, National Cancer Institute of Canada Clinical Trials G (2009) Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* **10**(5): 459-66

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO, European Organisation for R, Treatment of Cancer Brain T, Radiotherapy G, National Cancer Institute of Canada Clinical Trials G (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* **352**(10): 987-96

Tabatabai G, Stupp R, van den Bent MJ, Hegi ME, Tonn JC, Wick W, Weller M (2010) Molecular diagnostics of gliomas: the clinical perspective. *Acta Neuropathol* **120**(5): 585-92

Tanaka H, Sasayama T, Tanaka K, Nakamizo S, Nishihara M, Mizukawa K, Kohta M, Koyama J, Miyake S, Taniguchi M, Hosoda K, Kohmura E (2013) MicroRNA-183 upregulates HIF-1alpha by targeting isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2) in glioma cells. *J Neurooncol* **111**(3): 273-83

Turcan S, Rohle D, Goenka A, Walsh LA, Fang F, Yilmaz E, Campos C, Fabius AW, Lu C, Ward PS, Thompson CB, Kaufman A, Guryanova O, Levine R, Heguy A, Viale A, Morris LG, Huse JT, Mellinghoff IK, Chan TA (2012) IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature* **483**(7390): 479-83

Uhm JH, Ballman KV, Wu W, Giannini C, Krauss JC, Buckner JC, James CD, Scheithauer BW, Behrens RJ, Flynn PJ, Schaefer PL, Dakhill SR, Jaeckle KA (2011) Phase II evaluation of gefitinib in patients with newly diagnosed Grade 4 astrocytoma: Mayo/North Central Cancer Treatment Group Study N0074. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **80**(2): 347-53

van den Bent MJ (2010) Interobserver variation of the histopathological diagnosis in clinical trials on glioma: a clinician's perspective. *Acta Neuropathol* **120**(3): 297-304

van den Bent MJ, Dubbink HJ, Sanson M, van der Lee-Haarloo CR, Hegi M, Jeuken JW, Ibdaih A, Brandes AA, Taphoorn MJ, Frenay M, Lacombe D, Gorlia T, Dinjens WN, Kros JM (2009) MGMT promoter methylation is prognostic but not predictive for outcome to adjuvant PCV chemotherapy in anaplastic oligodendroglial tumors: a report from EORTC Brain Tumor Group Study 26951. *J Clin Oncol* **27**(35): 5881-6

van den Bent MJ, Gravendeel LA, Gorlia T, Kros JM, Lapre L, Wesseling P, Teepen JL, Idbaih A, Sanson M, Smitt PA, French PJ (2011) A hypermethylated phenotype is a better predictor of survival than MGMT methylation in anaplastic oligodendroglial brain tumors: a report from EORTC study 26951. *Clin Cancer Res* **17**(22): 7148-55

Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA (2007) Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* **318**(5858): 1931-4

Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O'Kelly M, Tamayo P, Weir BA, Gabriel S, Winckler W, Gupta S, Jakkula L, Feiler HS, Hodgson JG, James CD, Sarkaria JN, Brennan C, Kahn A, Spellman PT, Wilson RK, Speed TP, Gray JW, Meyerson M, Getz G, Perou CM, Hayes DN, Cancer Genome Atlas Research N (2010) Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* **17**(1): 98-110

Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM (2006) A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(7): 2257-61

von Deimling A, Korshunov A, Hartmann C (2011) The next generation of glioma biomarkers: MGMT methylation, BRAF fusions and IDH1 mutations. *Brain Pathol* **21**(1): 74-87

von Deimling A, Louis DN, von Ammon K, Petersen I, Wiestler OD, Seizinger BR (1992) Evidence for a tumor suppressor gene on chromosome 19q associated with human astrocytomas, oligodendrogliomas, and mixed gliomas. *Cancer Res* **52**(15): 4277-9

Wang Y, Wang X, Zhang J, Sun G, Luo H, Kang C, Pu P, Jiang T, Liu N, You Y (2012) MicroRNAs involved in the EGFR/PTEN/AKT pathway in gliomas. *J Neurooncol* **106**(2): 217-24

Wang Z, Gerstein M, Snyder M (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* **10**(1): 57-63

Wang Z, Zhang H, Zhang P, Li J, Shan Z, Teng W (2013) Upregulation of miR-2861 and miR-451 expression in papillary thyroid carcinoma with lymph node metastasis. *Med Oncol* **30**(2): 577

Watanabe K, Sato K, Biernat W, Tachibana O, von Ammon K, Ogata N, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (1997) Incidence and timing of p53 mutations during astrocytoma progression in patients with multiple biopsies. *Clin Cancer Res* **3**(4): 523-30

Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P, Ohgaki H (2009) IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *Am J Pathol* **174**(4): 1149-53

Weller M, Felsberg J, Hartmann C, Berger H, Steinbach JP, Schramm J, Westphal M, Schackert G, Simon M, Tonn JC, Heese O, Krex D, Nikkhah G, Pietsch T, Wiestler O, Reifenberger G, von Deimling A, Loeffler M (2009) Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a prospective translational study of the German Glioma Network. *J Clin Oncol* **27**(34): 5743-50

Weller M, Stupp R, Reifenberger G, Brandes AA, van den Bent MJ, Wick W, Hegi ME (2010) MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nat Rev Neurol* **6**(1): 39-51

- Wick W, Hartmann C, Engel C, Stoffels M, Felsberg J, Stockhammer F, Sabel MC, Koepfen S, Ketter R, Meyermann R, Rapp M, Meisner C, Kortmann RD, Pietsch T, Wiestler OD, Ernemann U, Bamberg M, Reifenberger G, von Deimling A, Weller M (2009) NOA-04 randomized phase III trial of sequential radiochemotherapy of anaplastic glioma with procarbazine, lomustine, and vincristine or temozolomide. *J Clin Oncol* **27**(35): 5874-80
- Woltering JM, Durston AJ (2008) MiR-10 represses HoxB1a and HoxB3a in zebrafish. *PLoS One* **3**(1): e1396
- Xia H, Yan Y, Hu M, Wang Y, Wang Y, Dai Y, Chen J, Di G, Chen X, Jiang X (2013) MiR-218 sensitizes glioma cells to apoptosis and inhibits tumorigenicity by regulating ECOP-mediated suppression of NF-kappaB activity. *Neuro Oncol* **15**(4): 413-22
- Xu J, Liao X, Wong C (2010) Downregulations of B-cell lymphoma 2 and myeloid cell leukemia sequence 1 by microRNA 153 induce apoptosis in a glioblastoma cell line DBTRG-05MG. *Int J Cancer* **126**(4): 1029-35
- Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins GJ, Friedman H, Friedman A, Reardon D, Herndon J, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B, Bigner DD (2009) IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med* **360**(8): 765-73
- Yang C, Wang C, Chen X, Chen S, Zhang Y, Zhi F, Wang J, Li L, Zhou X, Li N, Pan H, Zhang J, Zen K, Zhang CY, Zhang C (2013a) Identification of seven serum microRNAs from a genome-wide serum microRNA expression profile as potential noninvasive biomarkers for malignant astrocytomas. *Int J Cancer* **132**(1): 116-27
- Yang P, Wang Y, Peng X, You G, Zhang W, Yan W, Bao Z, Wang Y, Qiu X, Jiang T (2013b) Management and survival rates in patients with glioma in China (2004-2010): a retrospective study from a single-institution. *J Neurooncol*
- Yarden Y, Sliwkowski MX (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(2): 127-37
- Yekta S, Tabin CJ, Bartel DP (2008) MicroRNAs in the Hox network: an apparent link to posterior prevalence. *Nat Rev Genet* **9**(10): 789-96
- Zhao S, Lin Y, Xu W, Jiang W, Zha Z, Wang P, Yu W, Li Z, Gong L, Peng Y, Ding J, Lei Q, Guan KL, Xiong Y (2009) Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1alpha. *Science* **324**(5924): 261-5
- Zhao Y, Samal E, Srivastava D (2005) Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature* **436**(7048): 214-20
- Zhou X, Ren Y, Moore L, Mei M, You Y, Xu P, Wang B, Wang G, Jia Z, Pu P, Zhang W, Kang C (2010a) Downregulation of miR-21 inhibits EGFR pathway and suppresses the growth of human glioblastoma cells independent of PTEN status. *Lab Invest* **90**(2): 144-55
- Zhou X, Zhang J, Jia Q, Ren Y, Wang Y, Shi L, Liu N, Wang G, Pu P, You Y, Kang C (2010b) Reduction of miR-21 induces glioma cell apoptosis via activating caspase 9 and 3. *Oncol Rep* **24**(1): 195-201

ANEXO

Anexo 1. Tablas

Tabla 1. Correlación entre alteraciones moleculares en tumores de grado II y III.

Grado II y III		IDH1		Amplif. EGFR		EGFRvIII		Pérdida CDKN2A		Pérdida PTEN		Pérdida TP53		Metilación MGMT	
		sí	no	sí	no	sí	no	sí	no	sí	no	sí	no	sí	no
Amplificación EGFR	sí	10	24												
	no	18	6												
	p	0,001													
EGFRvIII	sí	3	6	8	1										
	no	21	21	23	17										
	p	0,473		0,127											
Pérdida CDKN2A	sí	12	19	22	8	8	17								
	no	17	9	10	15	1	22								
	p	0,064		0,016		0,024									
Pérdida PTEN	sí	3	20	19	4	7	14	18	4						
	no	25	8	11	20	2	24	12	20						
	p	<0,001		0,001		0,058		0,002							
Pérdida TP53	sí	6	6	10	2	2	9	6	5	6	4				
	no	24	23	23	22	7	32	25	21	17	29				
	p	1		0,055		1		1		0,288					
Metilación MGMT	sí	25	11	15	18	6	24	17	17	11	22	6	29		
	no	6	19	18	6	3	17	14	8	12	10	5	18		
	p	0,001		0,032		0,724		0,412		0,165		0,738			
Pérdida 1p/19q	sí	6	0	1	4	0	5	1	12	0	6	2	4	6	0
	no	12	14	17	9	5	20	14	12	14	11	3	23	18	8
	p	0,024		0,134		0,556		0,178		0,021		0,228		0,296	

Valor p: test exacto de Fisher. Significación estadística p<0,05

Tabla 2. Correlación entre alteraciones moleculares en GBM.

GBM		IDH1		Amplif. EGFR		EGFRvIII		Pérdida CDKN2A		Pérdida PTEN		Pérdida TP53		Metilación MGMT		Pérdida 1p/19q	
		sí	no	sí	no	sí	no	sí	no	sí	no	sí	no	sí	no	sí	no
Amplificación EGFR	sí	2	67														
	no	3	12														
	p	0,038															
EGFRvIII	sí	2	31	26	5												
	no	3	42	35	9												
	p	0,646		0,767													
Pérdida CDKN2A	sí	1	53	46	10	24	26										
	no	4	24	21	5	6	17										
	p	0,044		1		0,124											
Pérdida PTEN	sí	2	58	51	8	23	30	44	14								
	no	3	13	10	7	5	11	9	7								
	p	0,06		0,033		0,562		0,208									
Pérdida TP53	sí	0	17	15	2	6	8	10	7	12	1						
	no	5	61	53	13	25	36	45	19	47	15						
	p	0,58		0,725		1		0,392		0,276							
Metilación MGMT	sí	5	37	33	7	18	21	29	11	27	9	10	30				
	no	0	45	35	8	15	23	27	14	33	6	6	36				
	p	0,023		1		0,647		0,632		0,39		0,271					
Pérdida 1p/19q	sí	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0		
	no	4	19	18	5	13	10	15	6	14	7	4	19	14	9		
	p	0,208		0,25		1		1		0,364		1		1			
Pérdida NF1	sí	1	8	9	2	5	4	5	4	7	1	1	8	3	6	1	0
	no	1	29	28	2	10	19	22	7	20	9	4	25	13	16	0	10
	p	0,413		0,223		0,436		0,401		0,404		1		0,706		0,091	

Valor p: test exacto de Fisher. Significación estadística p<0,05

Tabla 3. Expresión diferencial de microRNAs en gliomas frente a tejido cerebral normal, ordenadas por columnas en orden creciente de p ajustado.

Tumor frente a cerebro normal			Tumor frente a cerebro normal		
microRNA	valor p	Magnitud	microRNA	valor p	Magnitud
hsa-miR-330	7.28E-14	-25.9	hsa-miR-30b	4.37E-06	-2.3
hsa-miR-331	3.11E-13	-3.7	hsa-miR-29a	5.15E-06	-3.1
hsa-miR-103	2.23E-12	-3.8	hsa-miR-7	5.18E-06	-13.1
hsa-miR-342	6.79E-12	-4.6	hsa-miR-375	6.14E-06	-48
hsa-miR-340	4.14E-11	-7.9	hsa-miR-656	6.68E-06	-11.3
hsa-let-7g	8.14E-11	-3.2	hsa-miR-219	7.45E-06	-73.7
hsa-miR-338	1.33E-10	-44.5	hsa-miR-32	9.83E-06	-4
hsa-miR-10b	1.71E-10	280.9	hsa-miR-137	9.99E-06	-22.5
hsa-miR-140	2.65E-10	-3.7	hsa-miR-128b	1.03E-05	-31.3
hsa-miR-425	3.00E-10	-4.9	hsa-miR-192	1.35E-05	-2.8
hsa-miR-181b	5.68E-10	-5	hsa-miR-107	1.37E-05	-8.3
hsa-miR-196b	1.34E-09	124.4	hsa-miR-544	1.42E-05	-3.6
hsa-let-7d	1.41E-09	-3.9	hsa-miR-182	1.73E-05	14
hsa-miR-190	1.46E-09	-8.9	hsa-let-7a	2.04E-05	-2.4
hsa-miR-328	1.54E-09	-5.2	hsa-miR-133a	2.28E-05	-9.5
hsa-miR-151	2.08E-09	-4.1	hsa-miR-95	2.50E-05	-5.9
hsa-miR-29c	2.38E-09	-6.4	hsa-miR-194	2.62E-05	-2.9
hsa-miR-98	5.51E-09	-4.2	hsa-miR-381	2.68E-05	-14.4
hsa-miR-23b	9.59E-09	-8.2	hsa-miR-186	2.81E-05	-2.5
hsa-miR-181c	1.46E-08	-4.3	hsa-miR-504	3.10E-05	-21.4
hsa-miR-139	2.10E-08	-38.4	hsa-miR-33	3.11E-05	-11.8
hsa-miR-594	3.01E-08	8.1	hsa-miR-203	3.49E-05	-27.8
hsa-miR-433	3.45E-08	-16.8	hsa-let-7f	4.05E-05	-2.6
hsa-miR-324-5p	3.87E-08	-4.1	hsa-miR-657	4.32E-05	-2.7
hsa-miR-213	4.16E-08	-4.7	hsa-miR-629	4.37E-05	8.9
hsa-miR-218	1.27E-07	-19.2	hsa-miR-153	5.08E-05	-13.7
hsa-miR-197	1.56E-07	-3.1	hsa-let-7b	5.64E-05	-2.4
hsa-miR-27b	1.90E-07	-6.7	hsa-miR-410	7.23E-05	-10.3
hsa-miR-181d	1.95E-07	-3	hsa-miR-129	7.69E-05	-38.3
hsa-miR-196a	2.66E-07	206.6	hsa-miR-569	0.000101488	-5.3
hsa-miR-365	2.82E-07	-3.7	hsa-miR-183	0.000109233	17.5
hsa-miR-125a	3.04E-07	-2.4	hsa-miR-133b	0.000129652	-9.2
hsa-miR-324-3p	6.77E-07	-2.5	hsa-miR-1	0.000130209	-12
hsa-miR-10a	7.95E-07	226.9	hsa-miR-126	0.000155415	-2.6
hsa-miR-26b	8.28E-07	-2.7	hsa-miR-374	0.000170306	-2.3
hsa-miR-148b	8.48E-07	-2.9	hsa-miR-383	0.000174582	-39.3
hsa-miR-372	8.82E-07	-4.9	hsa-miR-329	0.000269098	-10.6
hsa-miR-191	1.14E-06	-2.3	hsa-miR-323	0.000274455	-10.1
hsa-miR-425-5p	1.14E-06	-3	hsa-miR-127	0.000303649	-4.2
hsa-miR-517c	1.46E-06	-11.2	hsa-miR-548a	0.000446133	-5.9
hsa-miR-149	1.71E-06	-5.1	hsa-miR-485-3p	0.000481929	-7.4
hsa-miR-132	1.74E-06	-6.8	hsa-miR-30e-3p	0.000513203	-2
hsa-miR-487b	1.81E-06	-14.7	hsa-miR-606	0.00051565	-2.4
hsa-miR-184	1.97E-06	-31.7	hsa-miR-379	0.000552483	-5.7
hsa-miR-30e-5p	2.31E-06	-4	hsa-miR-189	0.0005617	-11.6
hsa-miR-490	2.37E-06	-36.6	hsa-miR-126	0.000592355	-2.3
hsa-miR-518c	2.48E-06	-3.1	hsa-miR-200a	0.000816695	-4.9
hsa-miR-30c	2.72E-06	-2.4	hsa-miR-552	0.000851892	-4
hsa-miR-491	2.81E-06	-6.9	hsa-miR-496	0.000903273	-8.6
hsa-miR-642	3.26E-06	-38.6	hsa-miR-34c	0.000945713	-15.3
hsa-miR-124a	3.58E-06	-67.7	hsa-miR-24	0.00103512	-1.9
hsa-miR-361	3.95E-06	-2.3	hsa-miR-376a	0.00106012	-7.3
hsa-miR-143	4.11E-06	-5.6	hsa-miR-202	0.00108911	-9.5
hsa-miR-101	4.18E-06	-3.4	hsa-miR-515-3p	0.00123712	-1.9
hsa-miR-326	4.25E-06	-14.7	hsa-miR-31	0.00125904	-5.6

Tumor frente a cerebro normal			Tumor frente a cerebro normal		
microRNA	valor p	Magnitud	microRNA	valor p	Magnitud
hsa-miR-578	0.0013248	-1.9	hsa-miR-411	0.00570081	-5
hsa-miR-202	0.00132888	-1.9	hsa-miR-512-3p	0.00584856	-5.6
hsa-miR-515-5p	0.00138431	-1.9	RNU6B	0.00626889	-1.9
hsa-miR-220	0.00156208	-1.8	hsa-miR-521	0.0069275	-1.8
hsa-miR-518f	0.00162765	-3	hsa-miR-658	0.006962	-1.8
hsa-miR-609	0.00169917	-2.1	hsa-miR-221	0.0073709	-3.5
hsa-miR-520g	0.001749	-3.3	hsa-miR-520d	0.00777291	-2.7
hsa-miR-125b	0.00179687	-1.9	hsa-miR-572	0.00786356	-2.5
hsa-miR-518e	0.00185568	-3.7	hsa-miR-302c	0.00945678	-5.5
hsa-miR-485-5p	0.00199027	-16.6	hsa-miR-601	0.00985901	-3.9
hsa-miR-518a	0.00207018	-2.5	hsa-miR-371	0.010268	-1.8
hsa-miR-520b	0.00209224	-1.8	hsa-miR-520c	0.0106277	-2.1
hsa-miR-382	0.00212455	-4.3	hsa-miR-548c	0.0118691	-1.8
hsa-miR-26a	0.00224219	-2.9	hsa-miR-99a	0.012242	-1.8
hsa-miR-325	0.00237602	-1.8	hsa-miR-185	0.0129271	-4.9
hsa-miR-30a-5p	0.00253402	-1.8	hsa-miR-562	0.0130358	-3.3
hsa-miR-100	0.00254528	-1.9	hsa-miR-369-3p	0.0142442	-5.6
hsa-miR-30d	0.00261595	-1.8	hsa-miR-208	0.015311	-1.8
hsa-miR-302a	0.00281929	-1.8	hsa-miR-613	0.01573	-2
hsa-miR-518c	0.00283426	-1.8	hsa-miR-22	0.0160105	-2.2
hsa-miR-575	0.00290604	-6.3	hsa-miR-302b	0.0164444	-3.3
hsa-miR-506	0.0031953	-1.8	hsa-miR-555	0.0171061	-3.1
hsa-miR-565	0.00348654	2.3	hsa-miR-373	0.0172129	-2.4
hsa-miR-661	0.0034951	-1.9	hsa-miR-99b	0.01742	-3.2
hsa-let-7e	0.0039383	-3.2	hsa-miR-21	0.0176049	3.5
hsa-miR-545	0.00413085	-5.1	hsa-miR-645	0.0181671	-2.1
hsa-miR-520h	0.00421974	-2.7	hsa-miR-542-5p	0.0183176	5.5
hsa-miR-523	0.00448281	-1.8	hsa-miR-302c	0.0197858	-1.7
hsa-miR-522	0.00452741	-1.8	hsa-miR-600	0.019935	-3.3
hsa-miR-345	0.00477214	-1.8	hsa-miR-615	0.0225854	17.1
hsa-miR-299-5p	0.00479071	-4.1	hsa-miR-514	0.0234616	-1.8
hsa-miR-206	0.00497278	-5.6	hsa-miR-429	0.0249592	-4.7
hsa-miR-432	0.00512066	-5.8	hsa-miR-204	0.0254654	-3.4
hsa-miR-369-5p	0.00517872	-8.7	hsa-miR-34b	0.0255716	-5.5
hsa-miR-205	0.00544762	-3.4	hsa-miR-484	0.0255753	-2.1

Tabla 4. Relación de microRNAs seleccionados por el programa Prophet (mediante un esquema supervisado de validación cruzada) como suficientes para separar las muestras tumorales de las normales.

microRNA	microRNA	microRNA
hsa-miR-330	hsa-miR-181c	hsa-miR-196b
hsa-let-7g	hsa-miR-23b	hsa-miR-218
hsa-miR-103	hsa-miR-10b	hsa-miR-490
hsa-miR-338	hsa-miR-324-5p	hsa-miR-101
hsa-miR-331	hsa-miR-151	hsa-miR-594
hsa-miR-140	hsa-miR-433	hsa-miR-191
hsa-miR-29c	hsa-miR-328	hsa-miR-517c
hsa-miR-342	hsa-miR-98	hsa-miR-27b
hsa-let-7d	hsa-miR-425	hsa-miR-365
hsa-miR-190	hsa-miR-148b	hsa-miR-30e-5p
hsa-miR-181b	hsa-miR-139	hsa-miR-132
hsa-miR-340	hsa-miR-181d	

Tabla 5. Expresión diferencial de microRNAs entre los nuevos grupos tumorales. Comparación entre grupos uno a uno. Se muestran los 30 primeros microRNAs diferencialmente expresados, con menor valor de p ajustado, ordenados en valores crecientes de p .

2 vs. 1			2 vs. 1		
microRNA	p	Magnitud	microRNA	p	Magnitud
hsa-miR-9	3,51E-12	-13,8	hsa-miR-506	1,47E-06	2,8
hsa-miR-9	1,81E-09	-11,1	hsa-miR-520b	1,56E-06	2,7
hsa-miR-146b	6,95E-09	9,9	hsa-miR-371	2,09E-06	2,9
hsa-miR-544	7,74E-09	3,7	hsa-miR-214	2,44E-06	8,2
hsa-miR-518c	4,48E-08	3,1	hsa-miR-518c	2,48E-06	2,7
hsa-miR-515-3p	5,36E-08	2,8	hsa-miR-22	3,01E-06	4,7
hsa-miR-578	6,46E-08	2,8	hsa-miR-31	3,99E-06	13,1
hsa-miR-155	8,02E-08	13,8	hsa-miR-563	4,92E-06	5,4
hsa-miR-21	8,04E-08	12,5	hsa-miR-199a	6,14E-06	6,6
hsa-miR-650	8,88E-08	23,6	hsa-miR-378	7,37E-06	4,6
hsa-miR-142-3p	1,26E-07	7,8	hsa-miR-488	1,34E-05	-16,4
hsa-miR-562	2,51E-07	12,4	hsa-miR-613	1,47E-05	3,0
hsa-miR-220	3,35E-07	2,7	hsa-miR-129	1,51E-05	-32,8
hsa-miR-142-5p	1,02E-06	6,3	hsa-miR-193a	1,63E-05	5,7

3 vs.1			3 vs.1		
microRNA	p	Magnitud	microRNA	p	Magnitud
hsa-miR-21	3,86E-12	9,9	hsa-miR-411	6,87E-07	6,5
hsa-miR-210	3,72E-10	7,8	hsa-miR-299-5p	9,44E-07	4,4
hsa-miR-199a	9,69E-10	5,8	hsa-miR-369-3p	1,23E-06	8,6
hsa-miR-146b	2,09E-09	4,5	hsa-miR-28	2,40E-06	1,9
hsa-miR-142-3p	2,79E-09	4,6	hsa-miR-24	2,57E-06	1,9
hsa-miR-376a	1,17E-08	6,2	hsa-miR-127	2,95E-06	3,4
hsa-miR-199b	1,79E-08	19,1	hsa-miR-22	3,03E-06	2,6
hsa-miR-193a	4,20E-08	4,4	hsa-miR-382	4,43E-06	4,3
hsa-miR-155	5,12E-08	5,4	hsa-miR-134	4,47E-06	6,2
hsa-miR-339	1,07E-07	2,8	hsa-miR-16	5,13E-06	1,8
hsa-miR-214	1,27E-07	4,6	hsa-miR-130a	5,16E-06	1,9
hsa-miR-1	1,68E-07	10,2	hsa-miR-27a	5,31E-06	2,4
hsa-miR-425-5p	1,71E-07	2,1	hsa-miR-379	6,05E-06	4,8
hsa-miR-135b	4,01E-07	5,6	hsa-miR-515-5p	6,23E-06	1,7
hsa-miR-142-5p	4,54E-07	3,4	hsa-miR-606	6,27E-06	2,0

3 vs. 2			3 vs. 2		
microRNA	p	Magnitud	microRNA	p	Magnitud
hsa-miR-9	8,52E-10	8,7	hsa-miR-485-5p	7,12E-05	47,4
hsa-miR-9	2,29E-08	8,7	hsa-miR-95	7,74E-05	6,0
hsa-miR-125b	2,16E-07	3,0	hsa-miR-485-3p	8,17E-05	12,0
hsa-miR-124a	2,76E-07	76,9	hsa-miR-195	8,47E-05	2,9
hsa-miR-410	2,85E-07	25,6	hsa-miR-299-5p	0,00010592	5,8
hsa-miR-130a	9,67E-07	3,0	hsa-miR-183	0,00011941	19,2
hsa-miR-656	3,20E-06	14,3	hsa-miR-411	0,00014701	8,4
hsa-let-7a	5,28E-06	2,4	hsa-miR-182	0,00014763	13,8
hsa-miR-129	1,36E-05	32,5	hsa-let-7c	0,00019203	2,8
hsa-miR-323	3,01E-05	19,5	hsa-let-7b	0,00023559	2,1
hsa-miR-544	3,79E-05	-2,3	hsa-miR-181c	0,00024045	2,5
hsa-miR-181d	4,28E-05	2,3	hsa-miR-376a	0,00028252	10,5
hsa-miR-132	5,15E-05	4,8	hsa-miR-16	0,00032343	2,0
hsa-miR-562	5,86E-05	-6,3	hsa-miR-30b	0,00043473	1,9
hsa-miR-488	6,40E-05	12,3	hsa-miR-382	0,00052349	5,2

Significación estadística $p < 0,05$

Tabla 6. Distribución de los casos, clasificados por grado y grupo de expresión de microRNAs, en función de sus alteraciones moleculares.

Tablas de contingencia GBMs (n=67)		Grupo de expresión de microRNAs			Tablas de contingencia gli y glii (n=47)		Grupo de expresión de microRNAs		
		1	2	3			1	2	3
Mutación IDH1	sí	2	0	3	Mutación IDH1	sí	22	0	2
	no	23	10	29		no	7	2	14
	p	1				p	<0,0001		
Amplificación EGFR	sí	24	6	22	Amplificación EGFR	sí	15	2	12
	no	1	4	10		no	12	0	3
	p	0,0085				p	0,228		
EGFRvIII	sí	14	7	9	EGFRvIII	sí	7	0	2
	no	11	3	21		no	22	2	13
	p	0,0463				p	0,804		
Pérdida CDKN2A	sí	14	6	25	Pérdida CDKN2A	sí	13	2	9
	no	9	4	7		no	15	0	5
	p	0,338				p	0,344		
Pérdida PTEN	sí	17	4	27	Pérdida PTEN	sí	8	1	11
	no	5	5	4		no	19	1	3
	p	0,0343				p	0,006		
Pérdida TP53	sí	4	2	6	Pérdida TP53	sí	7	0	2
	no	21	8	25		no	22	2	12
	p	1				p	0,805		
Metilación MGMT	sí	12	5	17	Metilación MGMT	sí	22	0	7
	no	12	5	15		no	6	2	8
	p	1				p	0,011		
Pérdida 1p/19q	sí	1	0	2	Pérdida 1p/19q	sí	5	0	0
	no	8	6	6		no	15	2	7
	p	0,594				p	0,378		
Pérdida NF1	sí	3	0	6					
	no	10	5	7					
	p	0,135							

Valor p: test exacto de Fisher para contingencia de la relación variable-grupo. Significación estadística p<0,05

Anexo 2. Figuras

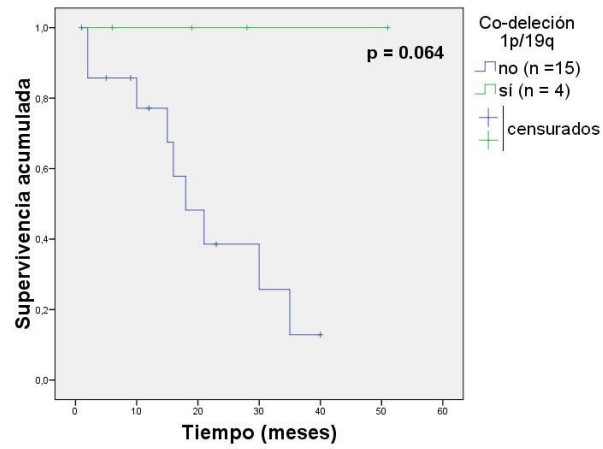


Figura 1. Curvas de supervivencia correspondientes a los pacientes con tumores de grado III, estratificación en función de la co-delección 1p/19q.

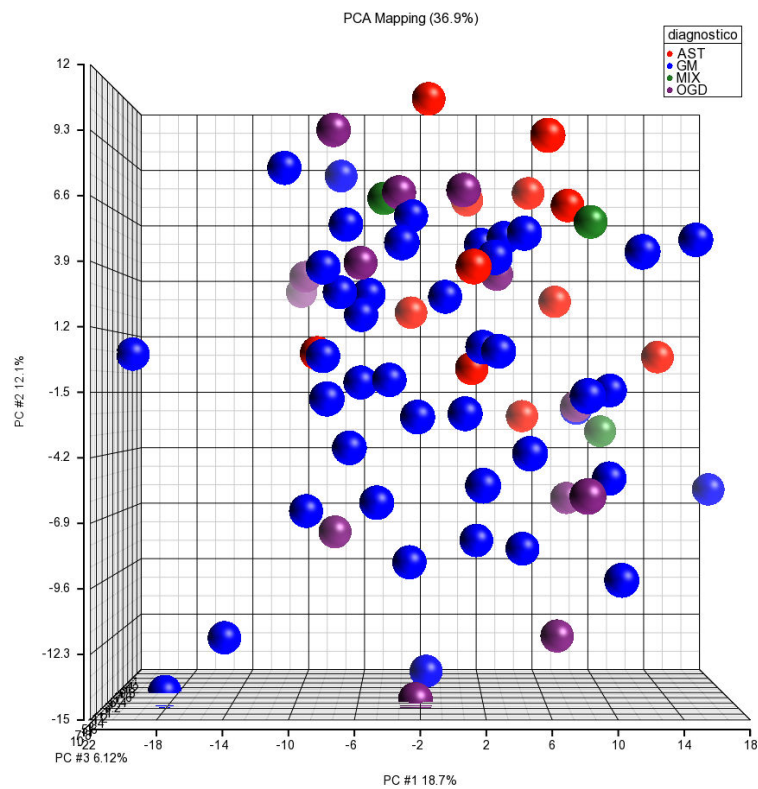


Figura 2. Análisis de componentes principales de gliomas e identificación posterior con los tipos histológicos correspondientes a cada tumor.

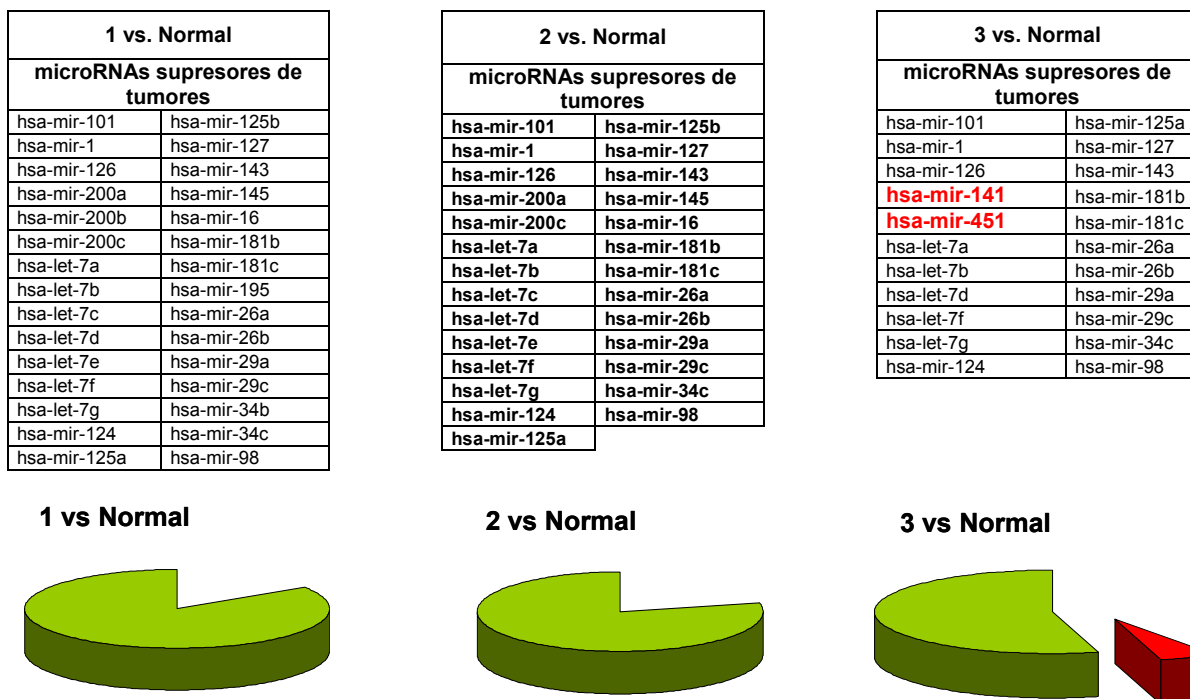


Figura 3. MicroRNAs supresores de tumores diferencialmente expresados entre controles y tumores de cada uno de los grupos. En la figura se representa el porcentaje de microRNAs supresores de tumores respecto al total de microRNAs así etiquetados por el programa TAM; el color verde representa los microRNAs reprimidos y el rojo los sobre-expresados. En la tabla se muestran los microRNAs con expresión diferencial.

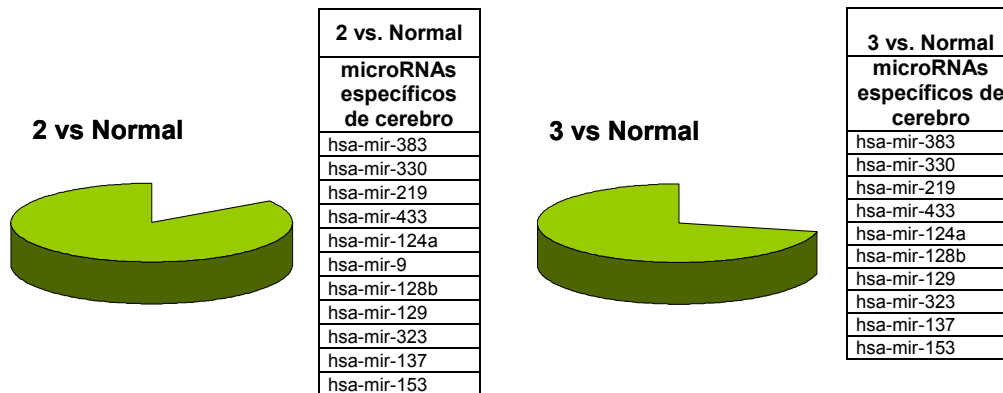


Figura 4. MicroRNAs específicos de cerebro diferencialmente expresados entre controles y tumores de cada uno de los grupos. En la figura se representa el porcentaje de microRNAs específicos de cerebro respecto al total de microRNAs así etiquetados por el programa TAM, todos ellos reprimidos (verde). En la tabla se muestran los microRNAs con expresión diferencial.