

**Patrones de amplificación de *EGFR*
en el glioblastoma, e identificación de biomarcadores
implicados en sus principales vías de señalización**

Dra. Lara Navarro Cerveró
Premio Alberto Rábano 2022
Fundación Romanillos

Madrid
16-11-2023





FACULTAD DE MEDICINA Y
ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

PATRONES DE AMPLIFICACIÓN DE *EGFR* EN EL GLIOBLASTOMA, E IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES IMPLICADOS EN SUS PRINCIPALES VÍAS DE SEÑALIZACIÓN



Dirigida por:

Dra. Concha López Ginés

Dr. Miguel Cerdá Nicolás

Presentada por:

Lara Navarro Cerveró

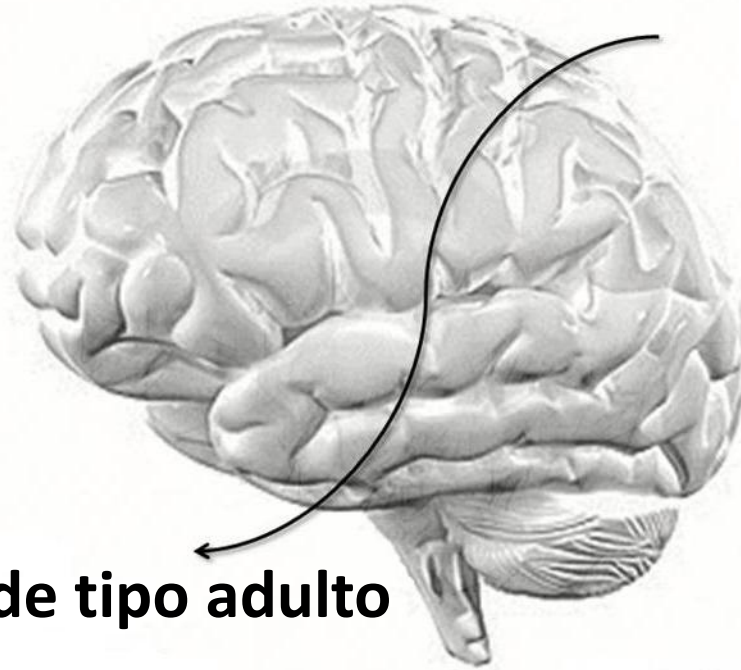
Valencia, 28 de octubre de 2022

INTRODUCCION

GLIOBLASTOMA

Gliomas

50% de los
Tumores SNC



Gliomas difusos de tipo adulto

Glioblastoma

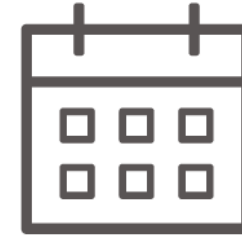
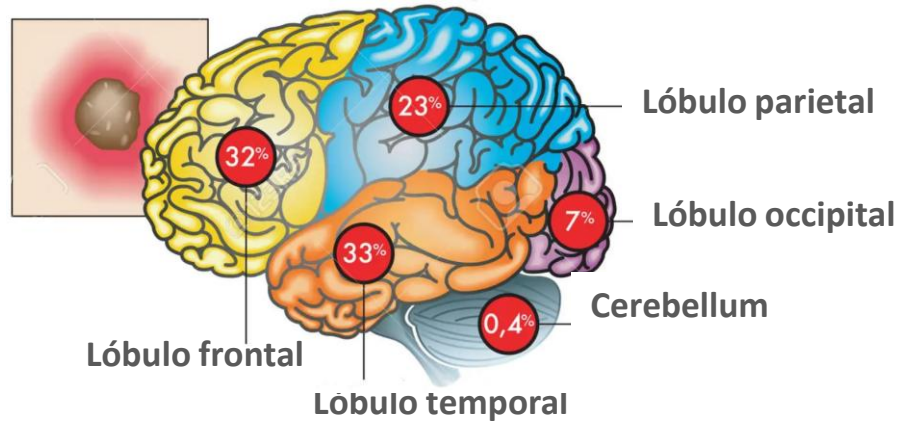
Astrocitoma

Oligodendroglioma

Invasión de estructuras encefálicas mediales

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

El glioblastoma es un tumor de tipo adulto, es el más común y la forma más agresiva del sistema nervioso central.



Población adulta
[45-70]

La tasa de incidencia es 1,6x mayor en hombres que en mujeres



15 meses

El pronóstico a largo plazo es malo. Las personas con GB generalmente sobreviven 15 meses después del diagnóstico.

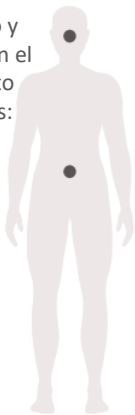


la tasa de supervivencia a 5 años es aprox. 5%

Tasa supervivencia **5%**

Sintomatología

Dependen del tamaño y ubicación del tumor en el cerebro. El seguimiento son síntomas comunes:



Dolor cabeza

Memoria y/o dificultades del habla

Debilidad en un lado del cuerpo

Problemas de equilibrio

Nauseas

Vómitos

Convulsiones

Somnolencia

Opciones tratamiento



Cirugía



Radioterapia



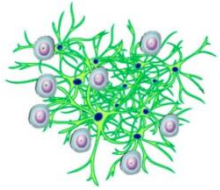
Quimioterapia

Resección + radioterapia post-operatoria + Temozolomida

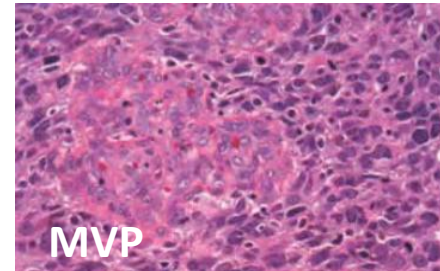
Estos tratamientos no son efectivos a largo plazo, y se necesita más investigación para desarrollar mejores terapias.

CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS

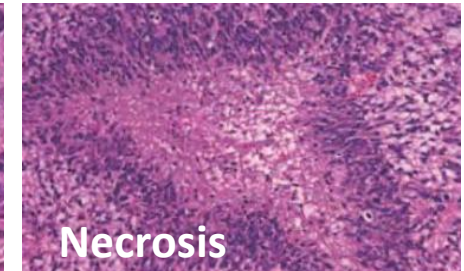
Glioblastoma



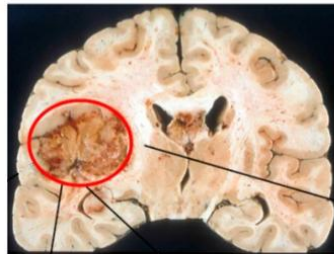
Aumento de la densidad celular



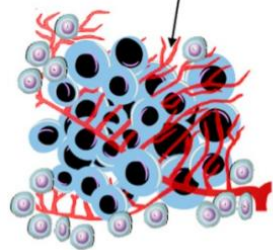
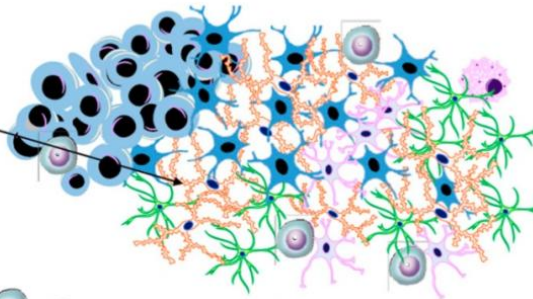
MVP



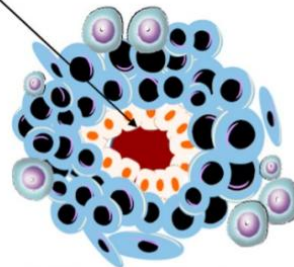
Necrosis



Invasión



Proliferación microvascular



Heterogeneidad morfológica y necrosis tumoral rodeada de células en empalizada

Glioblastoma

- Lesión maligna, mitóticamente activa.
- Necrosis
- Proliferación microvascular
- Evolución rápida



astrocito



Célula madre tumoral



Células tumorales



Células tumorales invasivas



Células empalizadas



microglia



oligodendrocito

Clasificación OMS 2021

META: Formular una clasificación que se aplique universalmente

WHO

1979

1993

2000

2007

Fenotipo (visual)

Histología
(H&E - IHQ)

**Nuevo paradigma de
clasificación de tumores del SNC**

2016

Integrar la alteración molecular y
genética

Fenotipo y genotipo

2021

Actualización diagnóstico y nomenclatura

Utilidad del **perfil de metiloma**

Práctica clínica



2007

GB 1ario vs GB 2ario

2016

GB IDH-wt vs GB IDH-mut

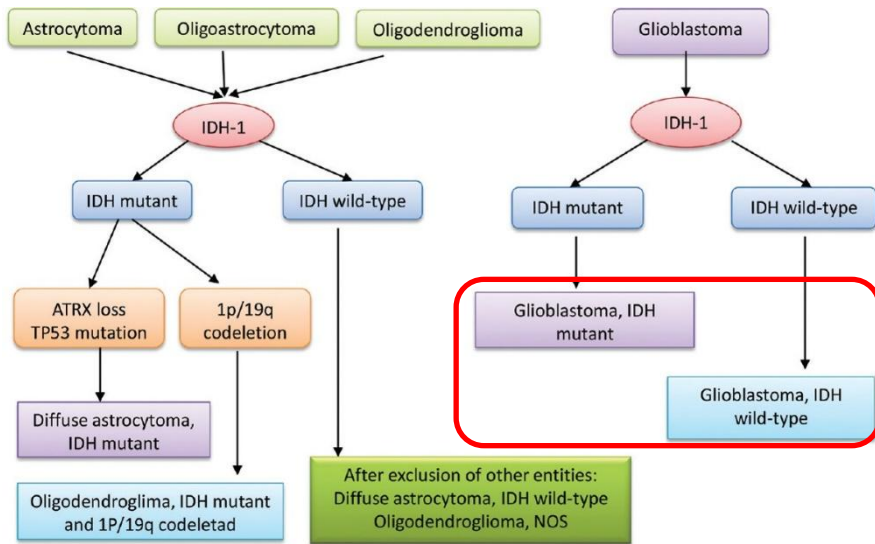
2021

GB (IDH-wt CNS OMS grado 4)
VS
Astrocitoma (IDH-mut CNS grado 4)

Clasificación OMS 2021

Clasificación actual de los principales gliomas difusos en adultos

Clasificación 2016

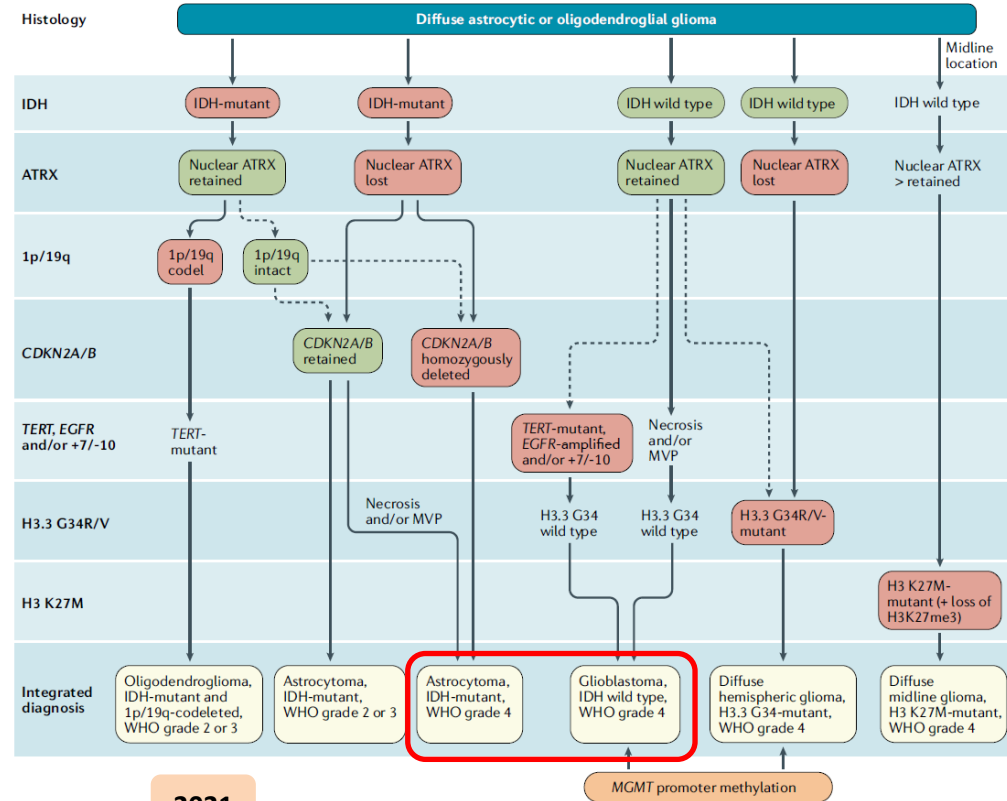


Acta Neuropathol (2016) 131:803-820

2016

GB IDH-wt
GB IDH-mut

Clasificación 2021



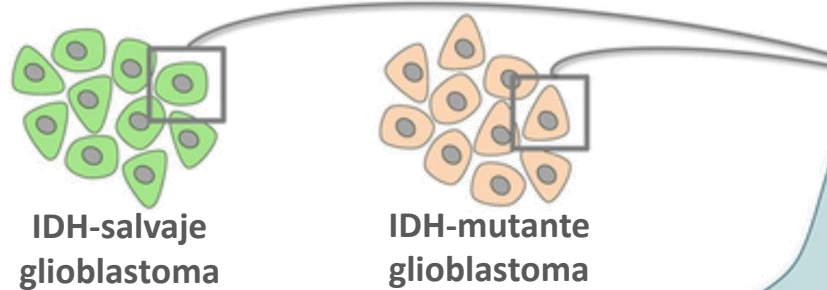
2021

GB IDH-wt CNS OMS grado 4
Astrocytoma IDH-mut CNS grado 4

Nat Rev Clin Oncol. 2022;19(5):357-358

HISTOPATOLOGÍA

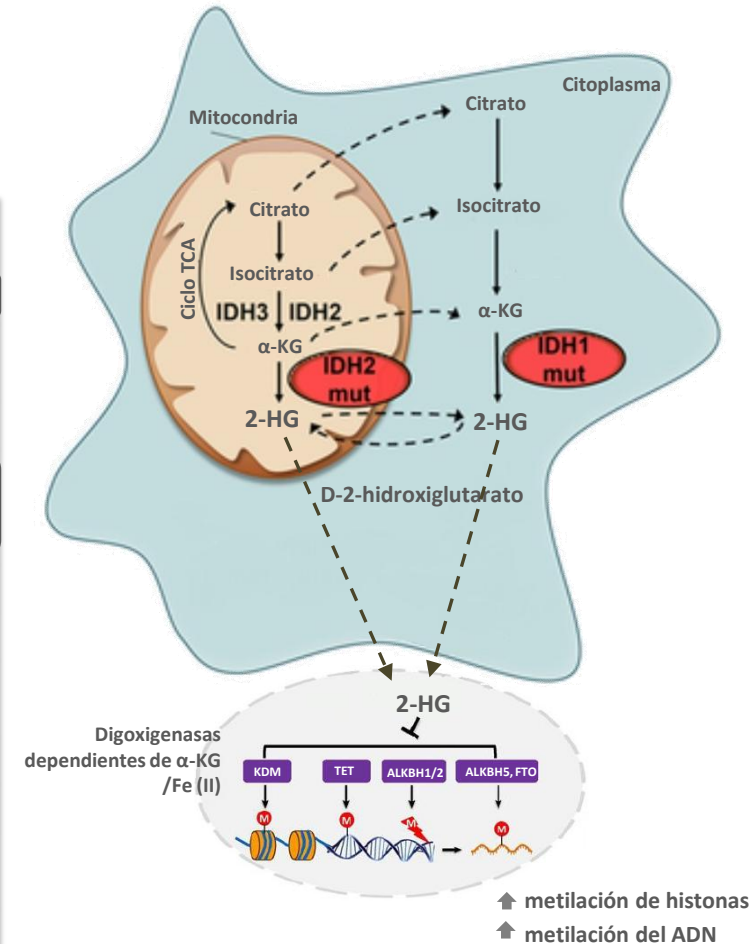
Principales diferencias en GB-IDHwt vs GB-IDHmut



IDH-salvaje glioblastoma

IDH-mutante glioblastoma

Nombre	Glioblastoma IDH salvaje	Glioblastoma IDH mutado
Proporción de GB	~90%	~10%
Edad media al diagnóstico	~62 años	~44 años
Hombre/mujer	1,42/1	1,05/1
Supervivencia media		
Cirugía + RT	9,9 meses	24 meses
Cirugía + RT + QT	15 meses	31 meses
Localización	Supratentorial	Preferentemente Frontal
Necrosis	Extensiva	Limitada
Mutaciones promotor <i>TERT</i>	72%	26%
Mutaciones <i>TP53</i>	27%	81%
Mutaciones <i>ATRX</i>	Rara	71%
Amplificación <i>EGFR</i>	35%-60%	Rara
Mutaciones <i>EGFRvIII</i>		Rara
Mutaciones <i>PTEN</i>	24%	Rara



Fenotipo metilador (G-CIMP)

Acta Neuropathol. 2016;131(6):803-820

J Blood Med. 2016;7:171-180

Vías de señalización alteradas en el GB

Vía de Rb (78%)

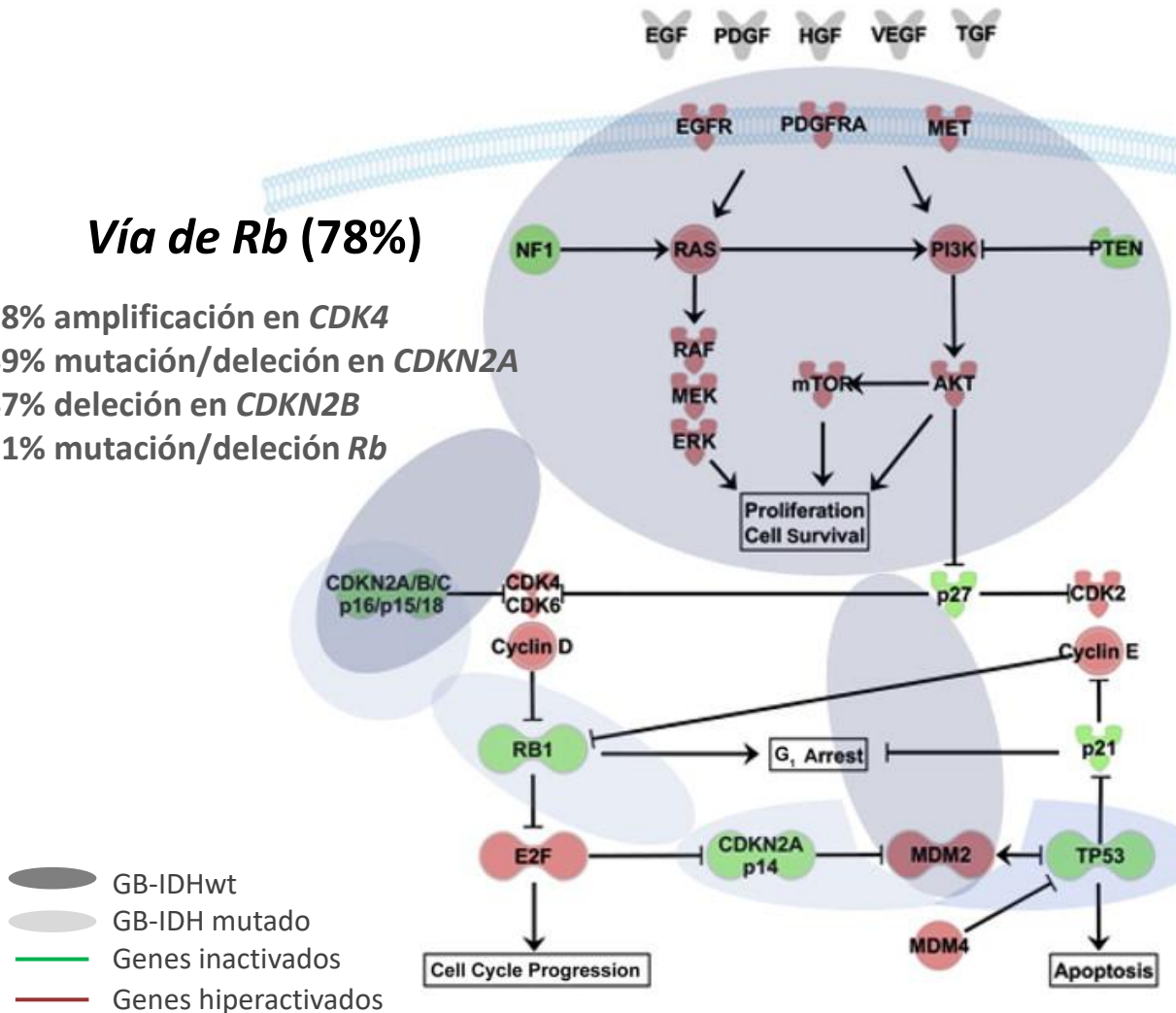
- 18% amplificación en *CDK4*
- 49% mutación/delección en *CDKN2A*
- 47% delección en *CDKN2B*
- 11% mutación/delección *Rb*

Vía de RTK/PI3K/PTEN (88%)

- 45% mutación/amplificación en *EGFR*
- 13% amplificación en *PDGFRA*
- 36% mutación/delección en *PTEN*
- 18% mutación/delección en *NF1*

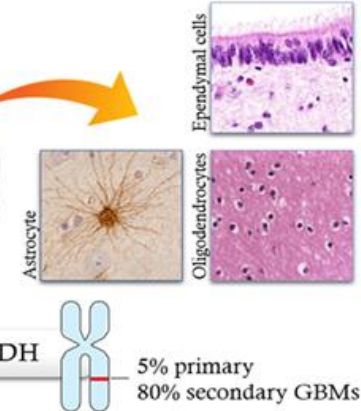
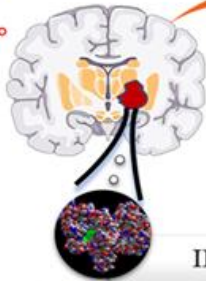
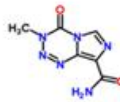
Vía de P53 (87%)

- 14% amplificación en *MDM2*
- 7% amplificación en *MDM4*
- 49% mutación/delección en *CDKN2A*
- 35% mutación/delección en *TP53*



Biomarcadores moleculares de importancia clínica

Temozolomide



IDH
5% primary
80% secondary GBMs

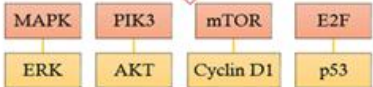
TERT

MGMT

H₃C 35-50% promoter methylation

EGFR

20-30% EGFRvIII
50% amplification



Front Oncol. 2018;8:123

Pronóstico favorable

Pronóstico desfavorable

<p>Mutación</p> <p>R132H R172K</p>	<p>IDH1-IDH2</p> <p>2q34/15q26.1</p> <p>Produce oncometabolito 2HG → inhibe enzimas dependientes α-KG Aumento de la metilación de histonas y del ADN</p>
<p>Hipermetilación</p> <p>Silenciamiento génico Pérdida de expresión</p>	<p>MGMT</p> <p>10q26.3</p> <p>Metilado en 35%-50% de los casos: ↓ reparación del ADN ↑ acumulo de agentes alquilantes Mejor respuesta a la quimioterapia</p>
<p>Amplificación</p> <p>En el 40-60% de los GB-IDHwt</p>	<p>EGFR</p> <p>7p12</p> <p>↑ Activador de la vía PI3K ↑ Activador de la vía MAPK</p>
<p>Mutación</p> <p>La variante III es la más frecuente (20-30%) Actividad constitutiva independiente de ligando</p>	<p>EGFRvIII</p> <p>7p12</p> <p>↑ Activador de la vía PI3K ↑ Activador de la vía MAPK</p>

El estado de *IDH* y la metilación de *MGMT* son los únicos biomarcadores identificados hasta la fecha con implicaciones **predictivas** en los resultados del tratamiento.

OBJETIVOS

❑ **Objetivo principal:**

Estudiar los diferentes **patrones de amplificación de *EGFR*** y su relación con nuevos biomarcadores o alteraciones genéticas en el GB.

❑ **Objetivos específicos:**

- 1) **Determinar**, en 150 muestras de estudio, el modelo de amplificación de *EGFR* y **la expresión de la variante III de EGFR**.
- 2) **Estandarizar la técnica** de determinación del *EGFR* mediante **MLPA** por comparación con las técnicas utilizadas hasta ahora (iFISH y q-PCR).
- 3) **Agrupar según el estatus del *EGFR* y evaluar** su utilidad clínica en términos de **supervivencia**.
- 4) **Estudiar alteraciones moleculares** mediante MLPA y secuenciación Sanger **y elaborar un modelo** que nos permita **clasificar e identificar subgrupos** en nuestra población de GB.
- 5) **Identificar** los genes y **las vías de señalización implicados** en los diferentes subgrupos.
- 6) **Determinar el valor pronóstico** de estos marcadores en nuestro grupo de pacientes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes y muestras

Pacientes



- Entre 24-81 años
- Diagnosticados entre los años 1995 y 2010.
- Muestras de biopsias de archivo del Servicio de Anatomía Patológica de Hospital Clínico Universitario de Valencia.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Pacientes sometidos a una biopsia de tumor glial de SNC en los años estipulados.
- Con estudio histológico compatible con el diagnóstico de GB.
- Con cantidad y calidad de material suficientes para la realización de estudios moleculares.
- Posean datos en la historia clínica.

Estudio clínico



- Sexo
- Edad
- Síntoma inicial
- Localización tumor
- Tamaño tumoral
- Cirugía
- Tratamiento
- Supervivencia

Recolección de tejido cerebral humano



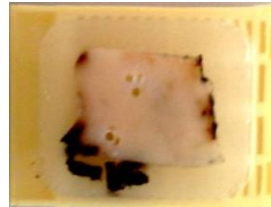
Tejido congelado a -80°C

36 tumores primarios



BIOPSIAS TUMORALES

Tejido fijado en formol y embebido en parafina



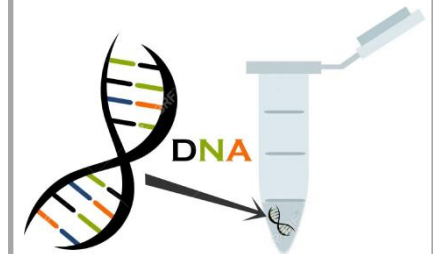
135 tumores primarios

2 tumores secundarios

137 CASOS TOTALES

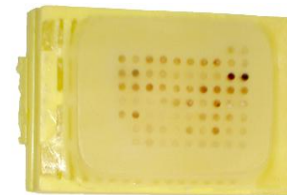
- Caracterizar alteraciones epigenéticas y medir perfiles metabólicos

Extracción ADN



- Caracterizar marcadores o alteraciones genéticas (mutaciones y CNAs)

Diseño y producción de TMAs



- Análisis histopatológico e inmunohistoquímico
- Estudio citogenético molecular

Métodos histopatológicos e inmunohistoquímicos

Definir la patología

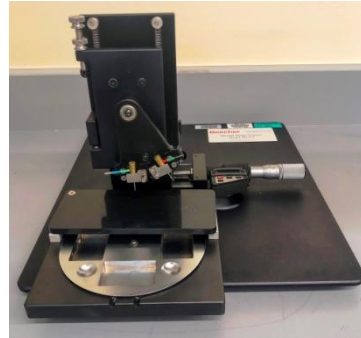
Construcción de Matrices Tisulares



Selección bloques donantes



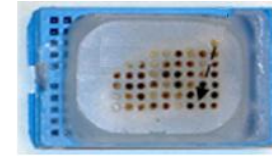
Tinción H&E marcaje zona interés



Manual Tissue Arrayer (Becheer Instruments)



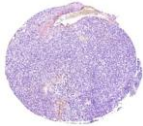
Construcción Tissue microarray



Construcción bloque receptor



Control calidad tinción H&E



Análisis histopatológico e inmunohistoquímico

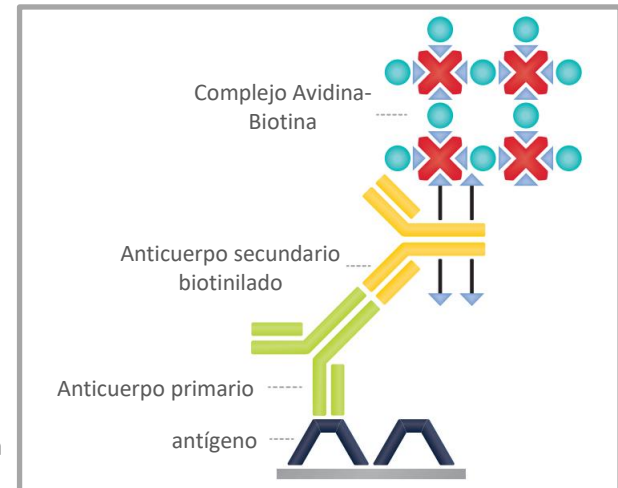
- Idoneidad de los *punch*
- Índice mitótico (10HPF)

Criterios expresión :

- 0 (no tinción)
- 1 (bajo o focal)
- 2 (moderado)
- 3 (fuerte)

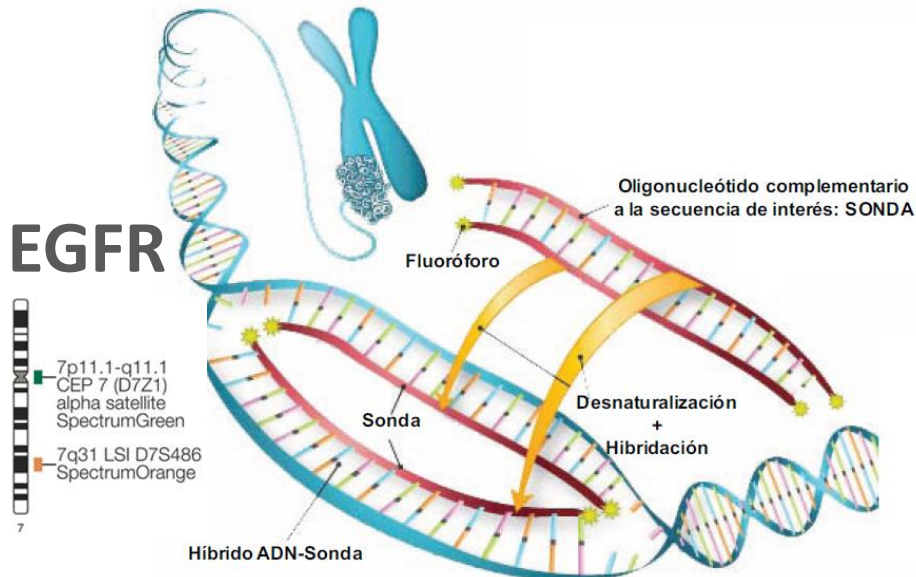
Anticuerpo	Laboratorio	Clon
GFAP	Dako	6F2
Ki67	Dako	MIB-1
EGFR	Dako	H11
LRP (MVP)	Santa Cruz	64

Método indirecto
Complejo Avidina-Biotina

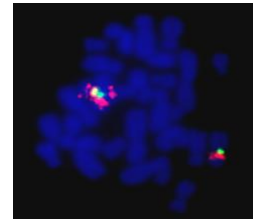


Citogenética Molecular (iFISH)

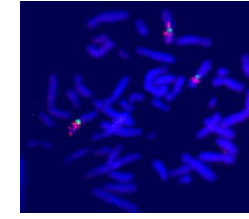
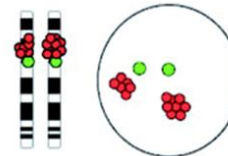
Patrones de amplificación



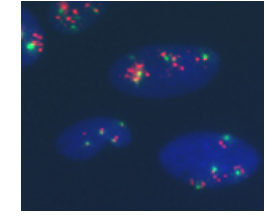
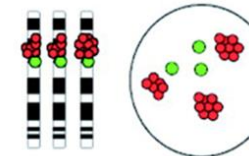
Bajo nivel de amplificación



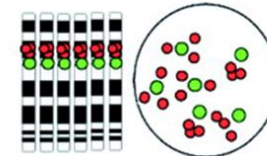
Disomía



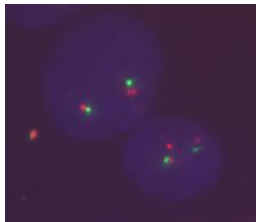
Trisomía



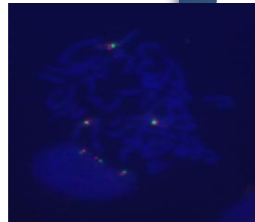
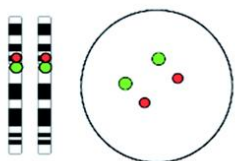
Polisomía



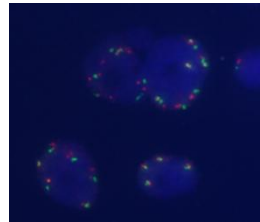
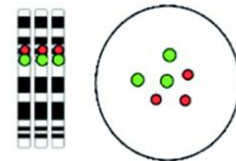
No amplificación



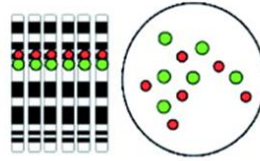
Disomía



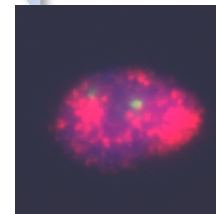
Trisomía



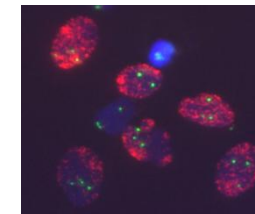
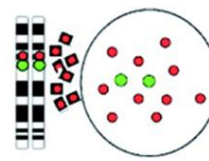
Polisomía



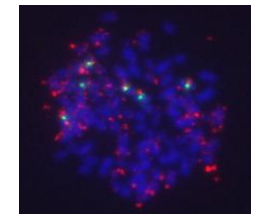
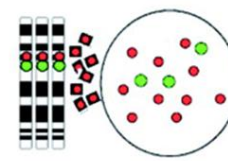
Amplificación de alto nivel



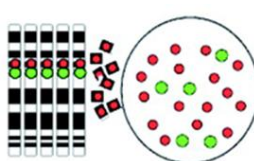
Disomía



Trisomía



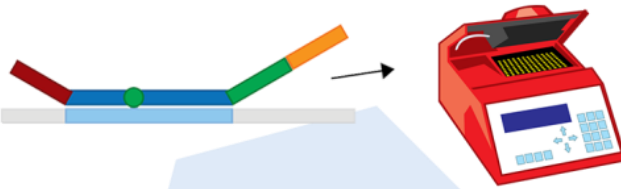
Polisomía



Técnicas Moleculares: MLPA y secuenciación Sanger

MLPA

MLPA ME024-A1 9p21
P105-C2 Glioma2



**Análisis
Coffalyser**



**Sequencing
Analysis**

Ganancia	>1,3
Normal	0,8-1,3
Delección	<0,8

Secuenciación Sanger

IDH1, IDH2, TP53

ddNTP marcados con fluorescencia

ddTTP (T) ddATP (A) ddGTP (G) ddCTP (C)

ADN molde

C T G A C T T C G A

G A C T G A A G C T

A C T G A A G C T

T G A A G C T

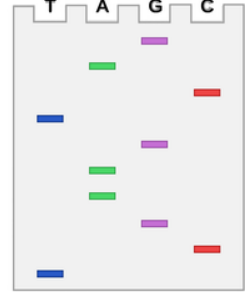
G A A G C T

A G C T

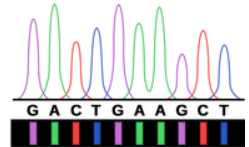
G C T

C T

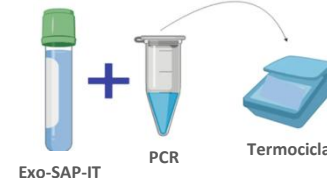
Separar mediante gel



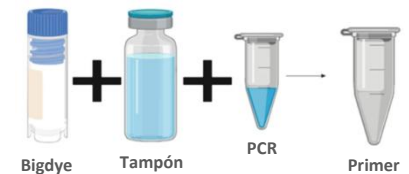
Usar una máquina secuenciadora



1-Purificación PCR



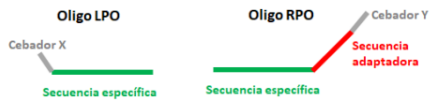
2-Reacción Secuenciación



3-Purificación reacción secuenciación



a- Desnaturalización de DNA e Hibridación



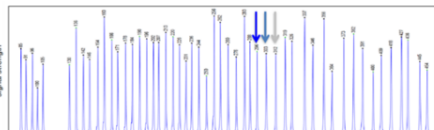
b- Reacción de Ligación



c- Reacción de Amplificación



d- Separación por electroforesis capilar

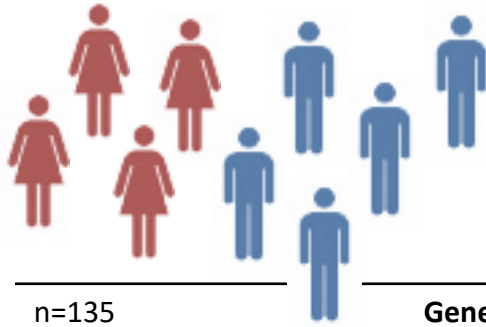


RESULTADOS Y DISCUSIÓN

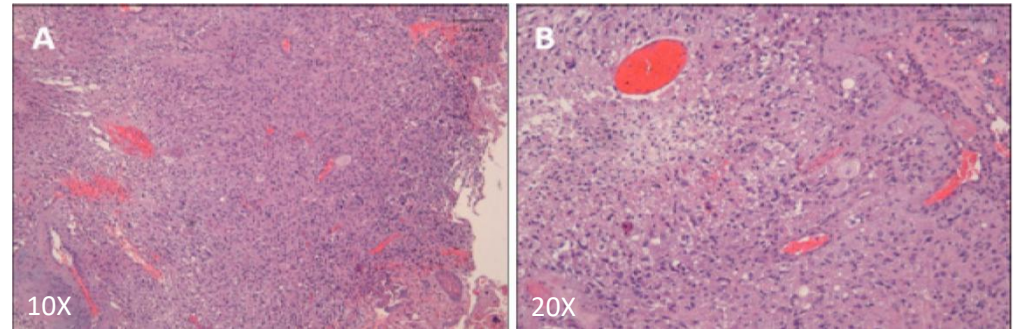
Datos clínicos e histopatológicos

Article
Identification of New Genetic Clusters in Glioblastoma Multiforme: EGFR Status and IDH3 Losses Influence Prognosis

Lara Navarro ^{1,2,*}, Teresa San-Miguel ^{1,3,4,*}, Javier Megias ^{1,3}, Nuria Santonja ², Silvia Calabuig ^{1,4,5}, Lisandra Muñoz-Hidalgo ¹, Pedro Roldán ⁶, Miguel Cerdá-Nicolás ^{1,3,7} and Concha López-Gines ^{1,3}



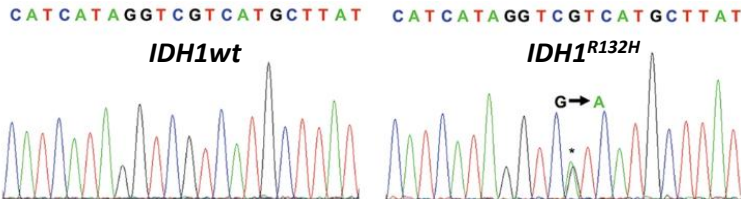
General	
n=135	
Sexo	46,0♀ / 54,0♂ (1:1,17)
Edad media	57,7 [24-81]
Localización	Lóbulo frontal: 20,3% Lóbulo parietal: 35,0% Lóbulo temporal: 36,6% Otros: 8,1%
Tamaño	5,2 cm [2-11]
Síntoma	Déficit neuronal: 30,0% Epilepsia: 21,7% Hipertensión intracraneal: 48,3%
Supervivencia	210 días



Hematoxilina-Eosina

Estado mutacional de IDH

n=135	IDH1wt (n=128)	IDH1m (n=7)
Sexo	43,7♀ / 56,3♂ (1:1,28)	77,8♀ / 22,2♂ (3,5:1)
Edad media	59,0 [24-81]	40,9 [32-52] p<0,001**
Localización	Lóbulo parietal: 33,9% Lóbulo frontal: 19,1% Lóbulo temporal: 38,3% Otros: 8,7%	Lóbulo parietal: 50,0% Lóbulo frontal: 37,5% Lóbulo temporal: 12,5%
Tamaño	5,1 cm [2-11]	6,0 cm [2-7]
Síntoma	Déficit neuronal: 32,1% Epilepsia: 21,4% Hipertensión intracraneal: 46,5%	Déficit neuronal: 0% Epilepsia: 25% Hipertensión intracraneal: 75,0%
Supervivencia	180 días	3.300 días p<0,001**



Alteraciones genéticas: Evaluación del estado del *EGFR*

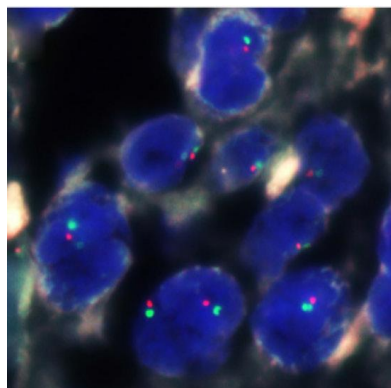
- Amplificación del gen *EGFR*



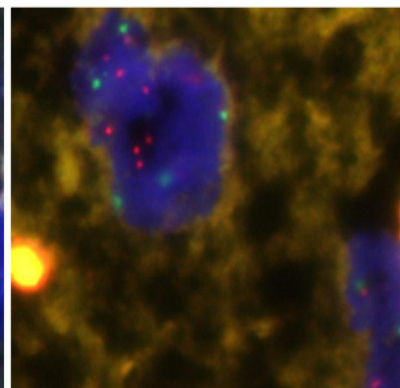
Objetivo principal
terapéutico

Patrones de amplificación

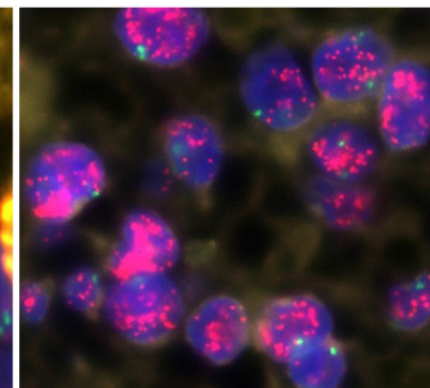
		<i>IDH1wt</i> n=128
Alteración		64,4%
FISH	H-amp	51,7%
	I-amp	12,7%
	N-amp	35,6%
MLPA	Ganancia	70,1%
	N-amp	29,9%



EGFR no-amp
35,6%



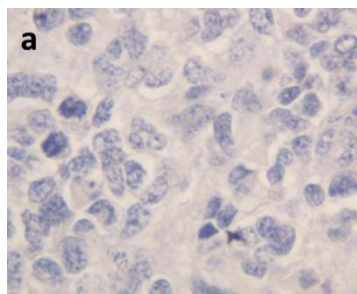
EGFR I-amp
12,7%



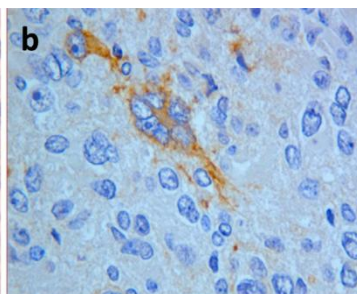
EGFR H-amp
51,7%

Índice Kappa de Cohen: 0.610

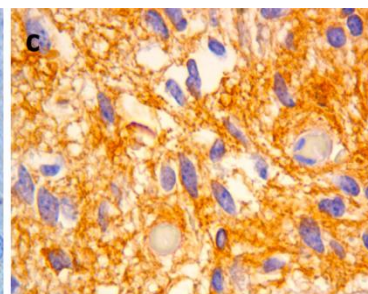
- Estudios inmunohistoquímicos: marcaje con anti-*EGFR*



Sin inmunoexpresión

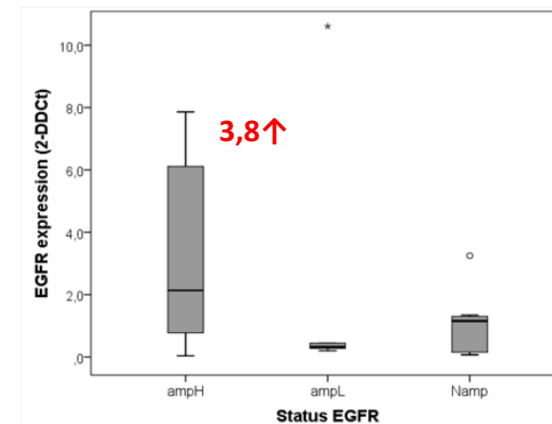


Tinción focal



Fuerte tinción

- Expresión del gen *EGFR*

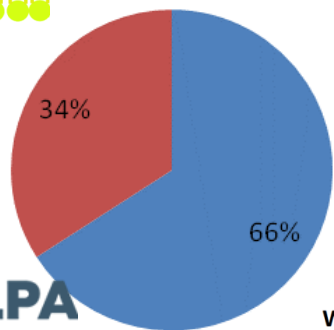
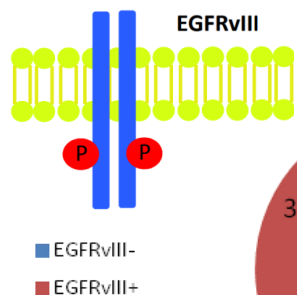


Alteraciones genéticas: Evaluación del estado del EGFR



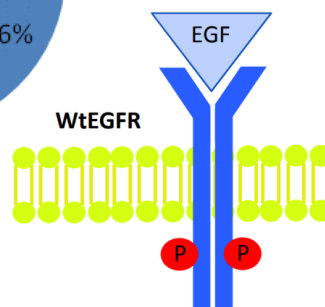
Diana terapéutica

- Presencia del mutante EGFRvIII



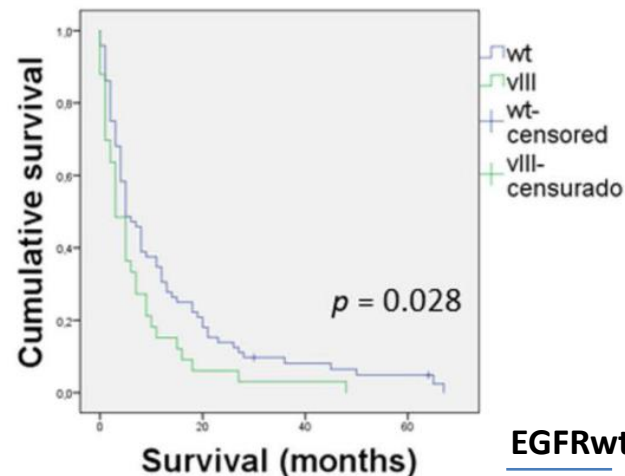
IDH1wt n=128

EGFR FISH	EGFRvIII MLPA	
	H-amp	51,7%
I-amp	12,7%	13,3%
N-amp	35,6%	23,8%



Supervivencia global

EGFRvIII



EGFRwt/ EGFRvIII

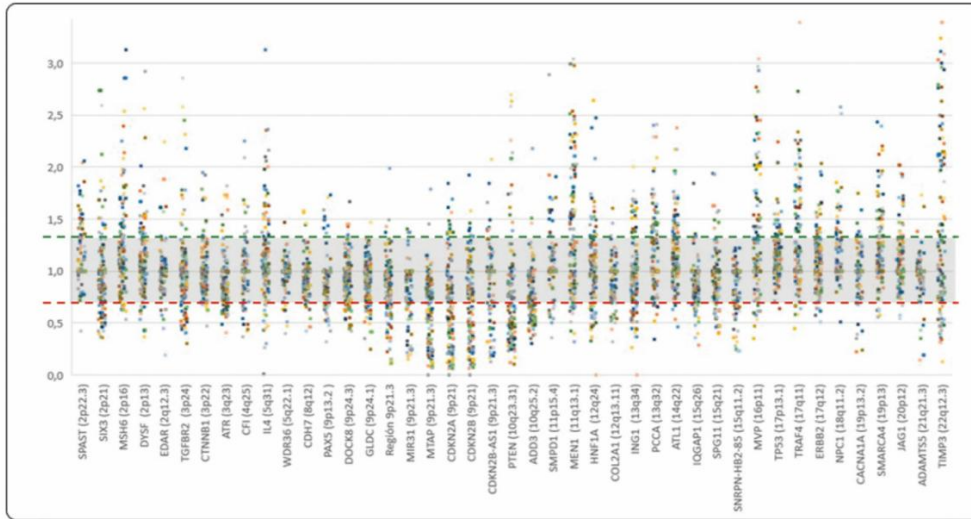
180 días/ 150 días

Datos clínicos



- ✗ Edad
- ✗ Localización tumor
- ✗ Tamaño tumoral
- ✓ Sexo: ↑ ↑ significativo presencia ♀ p=0,047*
- ✓ ↓ ↓ Supervivencia

Alteraciones genéticas: Caracterización SCNA por MLPA

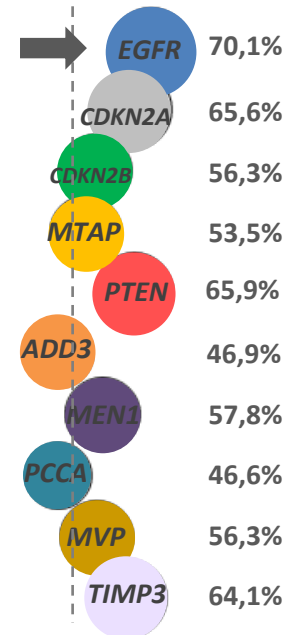
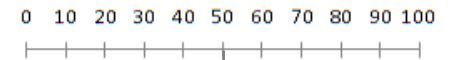
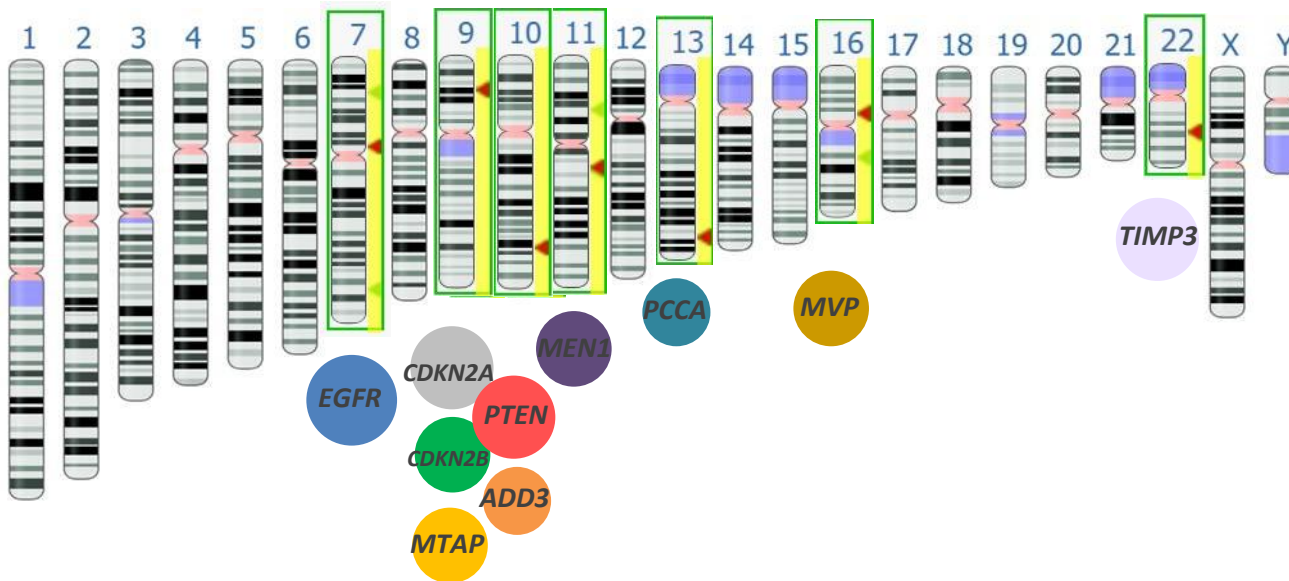


Genes	Other features
Name	Location
EGFR	Chr7: 55,019,017 – 55,211,628
CDKN2A	Chr9: 21,967,752 – 21,995,324
CDKN2B	Chr9: 22,002,903 – 22,009,313
MTAP	Chr9: 21,802,636 – 21,941,115
PTEN	Chr10: 87,863,625 – 87,971,930
ADD3	Chr10: 109,996,373 – 110,135,565
MEN1	Chr11: 64,803,516 – 64,811,294
PCCA	Chr13: 100,089,093 – 100,530,435
MVP	Chr16: 29,820,394 – 29,848,039
TIMP3	Chr22: 32,801,705 – 32,863,041



Alteraciones en el número de copias

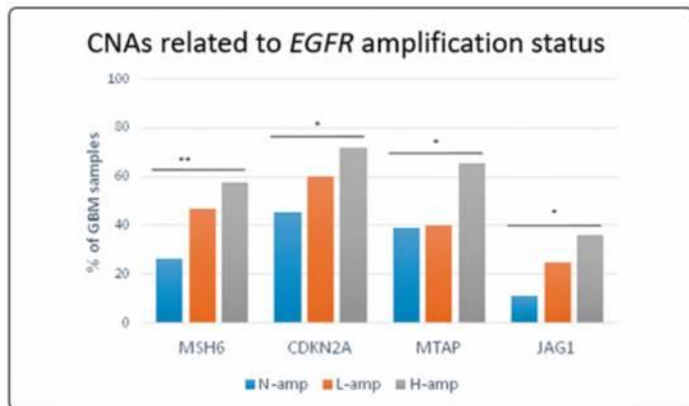
>45% de los casos



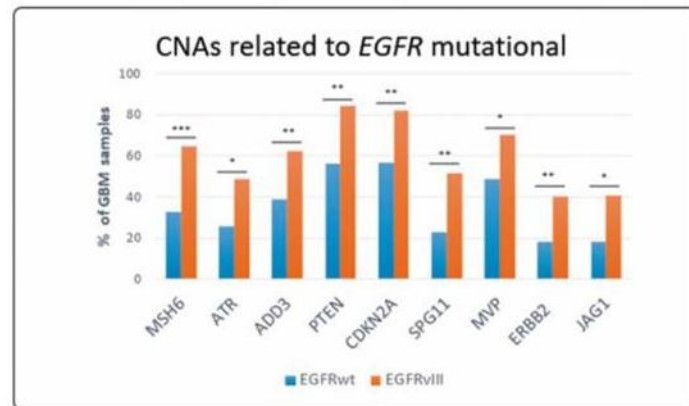
Alteraciones genéticas: Caracterización de SCNA por MLPA

- Variación en el número de copias

Patrones de amplificación del EGFR



Variante mutada EGFRvIII



cells **MDPI**

Article
Identification of New Genetic Clusters in Glioblastoma Multiforme: EGFR Status and ADD3 Losses Influence Prognosis

Lara Navarro ^{1,2,4}, Teresa San-Miguel ^{1,3,4,10}, Javier Megias ^{1,3}, Nuria Santonja ², Silvia Calabuig ^{1,4,5}, Lisandra Muñoz-Hidalgo ¹⁰, Pedro Roldán ⁶, Miguel Cerdá-Nicolás ^{1,3,7} and Concha López-Ginés ^{1,3}

EGFR

ERBB, ERBB1, HER1, NISBD2, PIG61, mENA

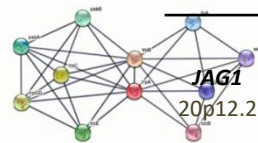
epidermal growth factor receptor

TCGA **Multiómica** cBioPortal FOR CANCER GENOMICS

transcriptomics
 proteomics
 genomics
 pharmacogenomics
 phenomics
 lipidomics
 metabolomics

	EGFR			
	Delección LOH	Diploide	Ganancia	Amplificación
CDKN2A				
9p21				
Delección OH	2	20	131	178
Delección LOH	3	19	48	38
Diploide	1	22	61	35
Ganancia	0	2	14	3
Amplificación	0	1	0	0

The STRING database



Delección OH	0	0	0	1
Delección LOH	1	3	13	1
Diploide	2	9	88	125
Ganancia	3	52	153	126
Amplificación	0	0	0	0

***n = 577; p < 0.00001; Chi-square 461.258

Delección OH	0	8	15	14
Delección LOH	1	3	13	1
Diploide	2	9	88	125
Ganancia	3	52	153	126
Amplificación	0	0	0	0

n = 576; p < 0.00001; Chi-square 41.9092

Delección OH	2	18	114	169
Delección LOH	3	21	61	46
Diploide	1	22	65	35
Ganancia	0	2	14	3
Amplificación	0	1	0	0

MVP = 571; p > 0.05; Chi-square 7.2998

Delección OH	2	18	114	169
Delección LOH	3	21	61	46
Diploide	1	22	65	35
Ganancia	0	2	14	3
Amplificación	0	1	0	0

***n = 570; p < 0.00001; Chi-square 46.413

EGFR y vías de señalización

- Vía CKDN2A/CDK4/RB1

- ❖ *CDKN2A* deleción
- ❖ *MTAP* deleción

- Vía EGFR/RAS/NF1/PTEN/PI3K

- ❖ *PTEN* deleción
- ❖ *ADD3* deleción

- Vía TP53/MDM2/MDM4/p14ARF

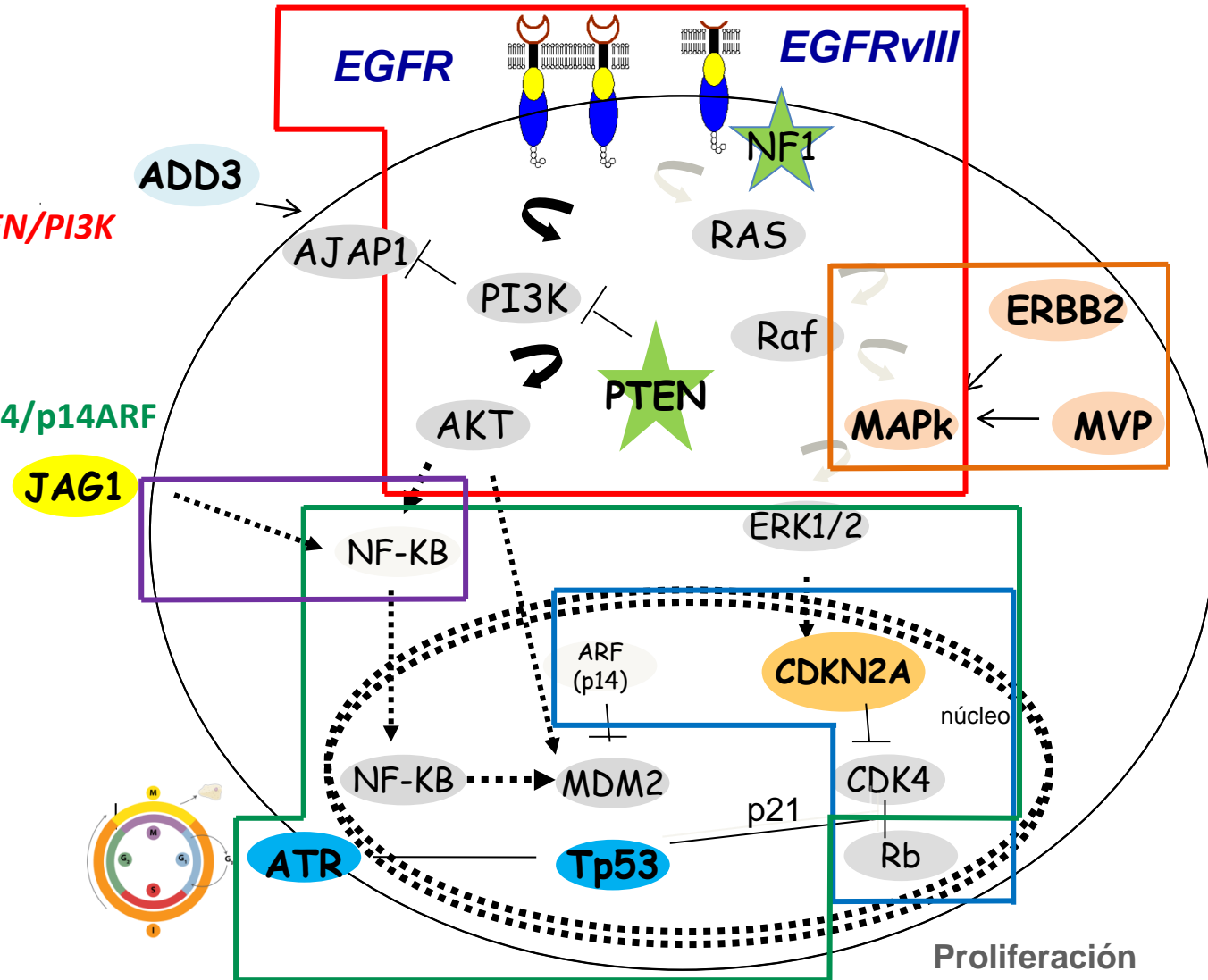
- ❖ *ATR* deleción

- Vía MAPK

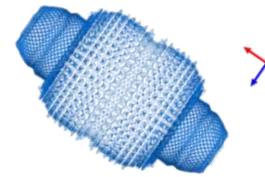
- ❖ *ERBB2* ganancia
- ❖ *MVP* ganancia

- Vía NOTH

- ❖ *JAG1* ganancia



Alteraciones genéticas: Caracterización de SCNA por MLPA



MVP

LRP, VAULT1

major vault protein

Neuroscience 207 (2015) 243–251

ALTERATION OF MAJOR VAULT PROTEIN IN HUMAN GLIOBLASTOMA AND ITS RELATION WITH EGFR AND PTEN STATUS

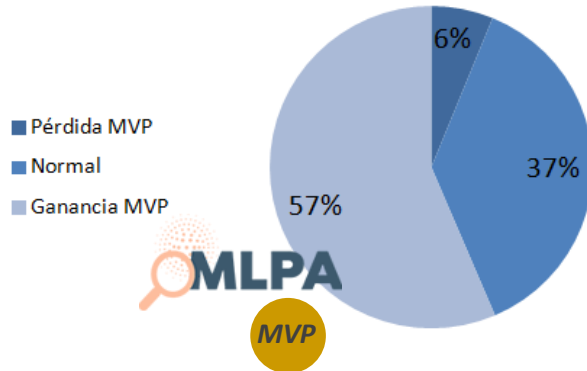
L. NAVARRO,^a R. GIL-BENSO,^{a,b} J. MEGÍAS,^a L. MUÑOZ-ARZALDO,^a T. SAN-MIGUEL,^a R. C. CALLAGHAN,^a J. M. GONZÁLEZ-ARBER,^a C. LÓPEZ-GINES^a AND M. J. CERDA-NICOLAS^a

Key words: epidermal growth factor receptor wild type (EGFRwt), epidermal growth factor receptor variant II (EGFRvII), glioblastoma (GBM), multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), major vault protein (MVP), phosphatase and tensin homolog (PTEN).

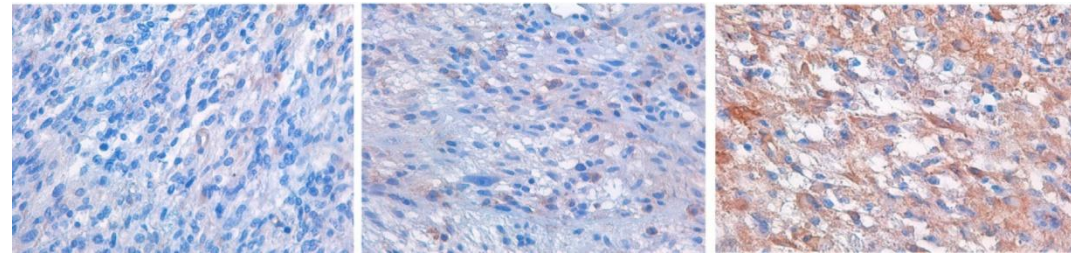
^aDepartment of Pathology, Universidad de Valencia, Valencia, Spain

^bService of Neurosurgery, Clínic Hospital, Valencia, Spain

- Variación en el número de copias de MVP



- Estudios inmunohistoquímicos: marcaje con anti-LRP (MVP)



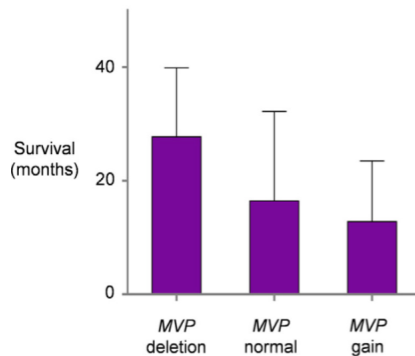
Sin inmunexpresión

Expresión normal

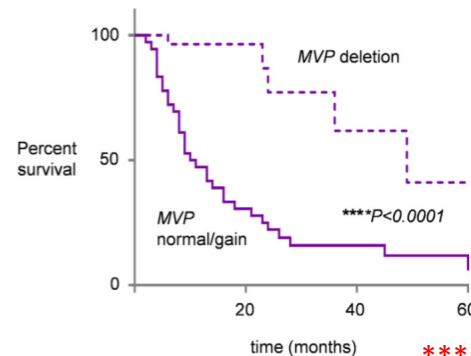
Alta expresión

- Relación entre las dosis de MVP y la supervivencia

Relation between MVP dosages and survival (Pearson coefficient MVP-survival 0.33, * $P < 0.05$)



Survival distribution function

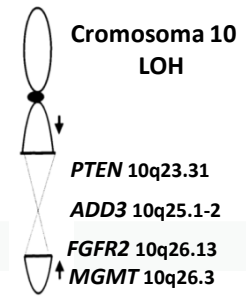


*** $p < 0.0001$

- Relación entre MVP y EGFRvIII

Parameter	Specification	MVP gene dosage (n° cases)		Total
		Amplification (MVP > 1.3)	No amplification (MVP < 1.3)	
EGFRvIII	No	38	40	78
	Yes	26 74%	9	35
SCNA EGFR	Gain	42	30	72
	Normal	22	19	41
Total		64	49	113

Alteraciones genéticas: Caracterización de SCNA por MLPA

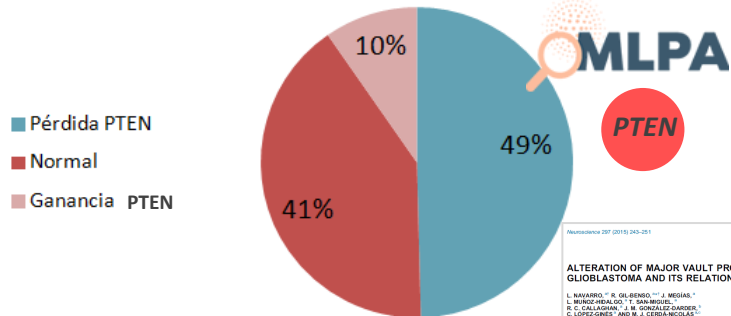


PTEN

10q23del, BZS, CWS1, DEC, GLM2, MHAM, MMAC1, PTEN1, TEP1

phosphatase and tensin homolog

- Variación en el número de copias de PTEN



Referencia: DOI: 10.1002/1471-2575.1201

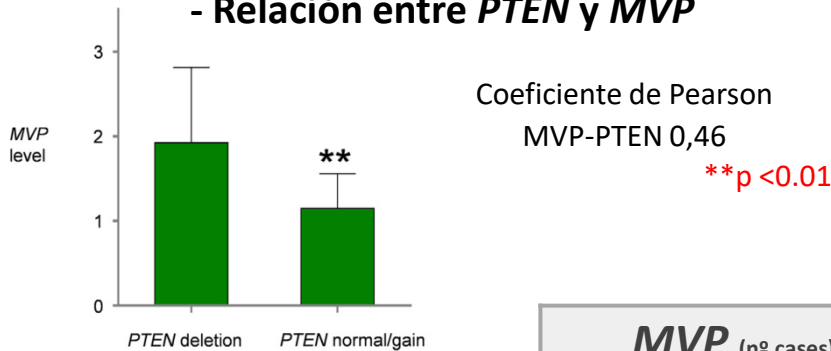
ALTERATION OF MAJOR VAULT PROTEIN IN HUMAN GLIOBLASTOMA AND ITS RELATION WITH EGFR AND PTEN STATUS

L. NAVARRO¹, R. DELBENGO¹, J. MEDIALA², L. MUNOZ-REVALLOS³, T. SANMIGUEL⁴, R. S. CALABRINO⁵, J. B. SORRELLER-GARDER⁶, C. LÓPEZ-OLIVERA⁷, ADD3⁸, J. C. BARRAL-RODRÍGUEZ⁹, C. LÓPEZ-OLIVERA⁷, ADD3⁸, J. C. BARRAL-RODRÍGUEZ⁹

Key words: epidermal growth factor receptor, wild type (EGFR), epidermal growth factor receptor variant 3 (EGFRv3), glioblastoma (GBM), multiple system-dependent protein amplification (MSDPA), major vault protein (MVP), phosphatase and tensin homolog (PTEN)

¹Department of Pathology, Universidad de Valencia, Valencia, Spain
²Department of Neurology, Clinic Hospital, Valencia, Spain
³Service of Pathology, Clinic Hospital, Valencia, Spain

- Relación entre PTEN y MVP



MVP (nº cases)				
Parameter	Specification	Amplification	No amplification	Total
PTEN	Gain	0	11	11
	Normal	21	25	46
	Loss	43	13	56
Total		64	49	113

ADD3

ADDL, RP11-25207.3

adducin 3 (gamma)

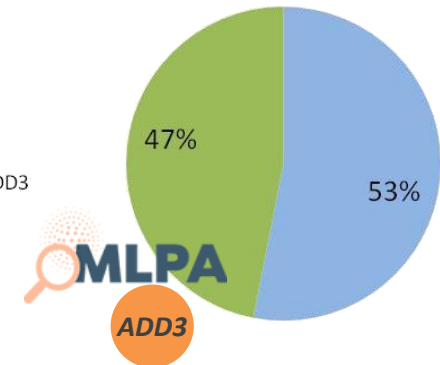
- Variación en el número de copias de ADD3

cells MDPJ

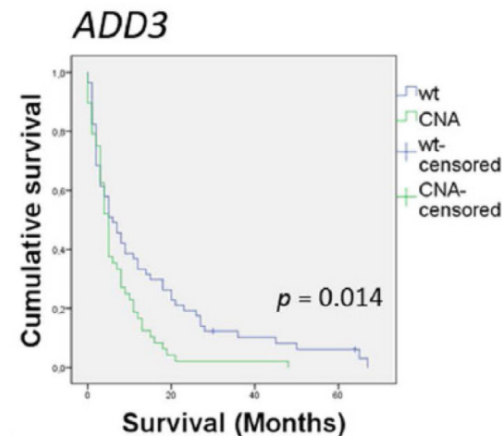
Article
Identification of New Genetic Clusters in Glioblastoma Multiforme: EGFR Status and ADD3 Losses Influence Prognosis

Lara Navarro^{1,2,3}, Irene San-Miguel^{1,2,3,4,5}, Javier Magaña^{1,2}, Noelia Santamía², Silvia Calabro^{1,6,7}, Elisavinda Muñoz-Hidalgo^{1,8}, Pedro Balleza^{1,9}, Miguel Cerdas-Nicolini^{1,8,7} and Concha López-Olivares^{1,3}

■ Normal
■ Deleción ADD3



- Supervivencia global



ADD3wt/ ADD3del

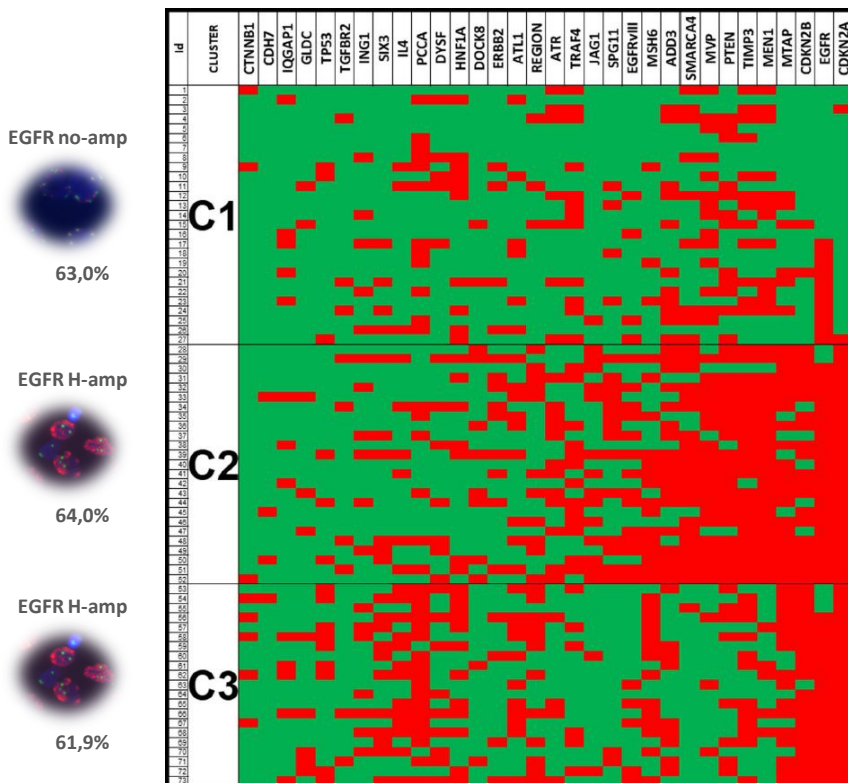
13,5 meses/7 meses

***p=0.014

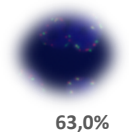
Clasificación genética de GB: distribución de los casos por subgrupos



Clasificación de conglomerados jerárquicos



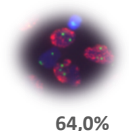
EGFR no-amp



63,0%

C1

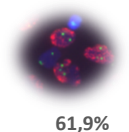
EGFR H-amp



64,0%

C2

EGFR H-amp



61,9%

C3

Grupo 1 (C1)

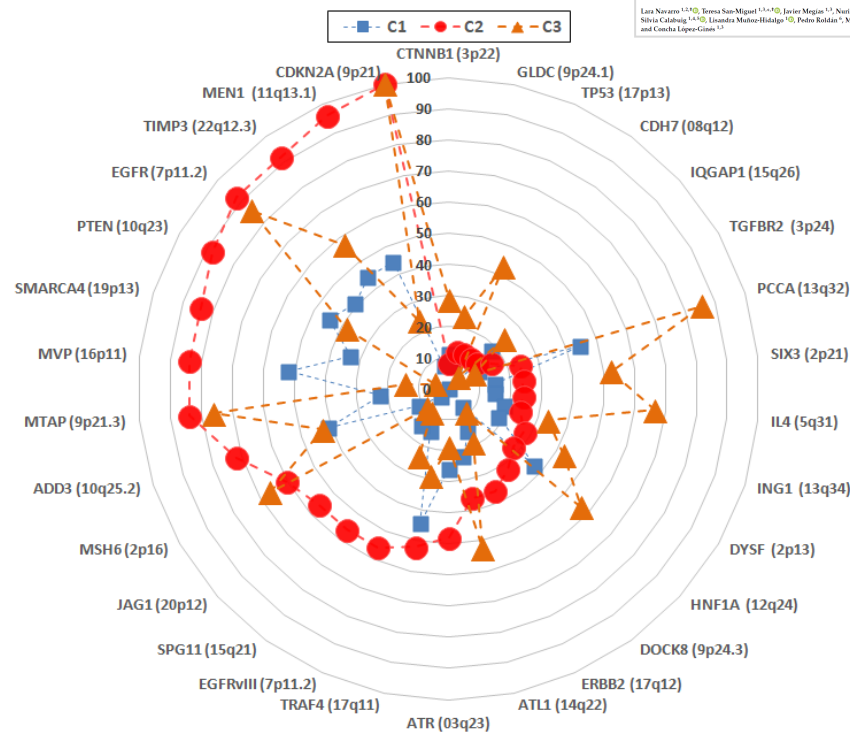
- Menor alteración

Grupo 2 (C2)

- El 48% de los loci estudiados estaban alterados en más del 50% casos
- Mayor alteraciones asociadas a la supervivencia: *MVP*, *ADD3* y *EGFRVIII*

Grupo 3 (C3)

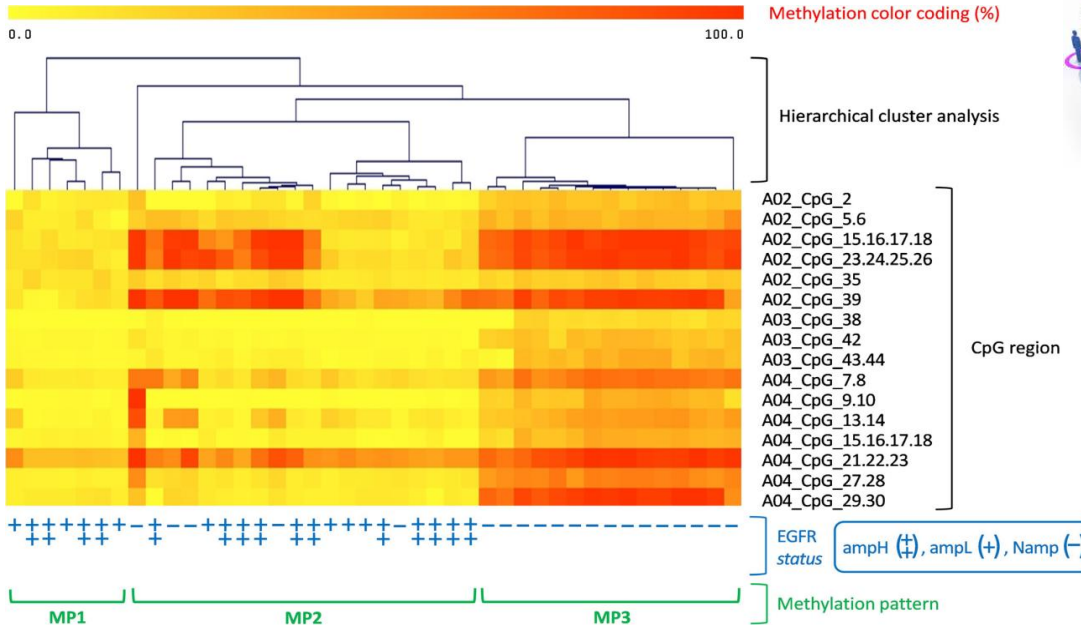
- Situación intermedia (38,4%)
- SCNAs frecuentes en *TP53*, *IL4*, *PCCA* y *SIX3*



cells
AMC
Identification of New Genetic Clusters in Glioblastoma Multiforme: *EGFR* Status and *ADD3* Losses Influence Prognosis
Luis Navarro ^{1,2,10}, Teresa San-Miguel ^{1,3,4,10}, Javier Mejías ^{1,5}, Nuria Santonja ¹, Silvia Calabig ^{1,6,10}, Lucinda Muñoz-Hidalgo ¹⁰, Pedro Rábano ¹, Miguel Cereza-Nicolás ^{1,6,7} and Concha López-Otin ^{1,8}

Estado de amplificación de EGFR: metilación y metabólica

Estado metilación promotor ARF1



Patrón metilación 1 (MP1)

**EGFR amplificado
ARF1 hipometilado**

- ↑ [Colina]
- ↑ [Fosfocolina]
- ↑ [Glutamato]
- ↑ [Uracilo]
- ↑ [Glutación total]
- ↓ [Ácidos grasos totales]

Patrón metilación 2 (MP2)

ARF1 nivel variable de metilación

Perfiles metabólicos

Cambios metabólicos, estadísticamente significativos

Patrón metilación 3 (MP3)

**EGFR no amplificado
ARF1 metilado**

Precusores de membrana
Metabolitos donantes de metilo



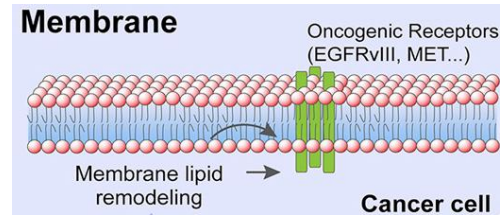
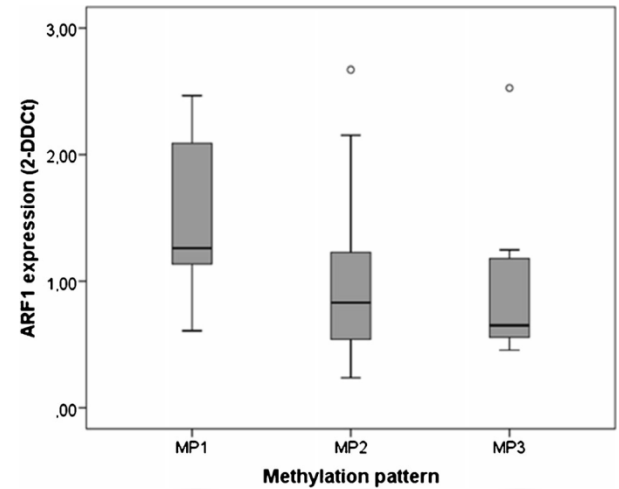
Cell Oncol.
DOI: 10.1007/s13402-017-0329-5

ORIGINAL PAPER

Association between epidermal growth factor receptor amplification and ADP-ribosylation factor 1 methylation in human glioblastoma

Cancha López-Gil¹, Lara Navarro², Lisandra Muñoz-Hidalgo³, Enrique Bosa¹, José Manuel Morales⁴, Rosario Gil-Benito¹, Mariela Gregori-Romero¹, Javier Megias⁵, Pedro Roblaño⁶, Remedios Segura-Sabater⁷, José Manuel Alberich-Silla⁸, Daniel Monleon^{1,2}, Miguel Cerda-Nicolás⁹

Expresión ARNm vs nivel de metilación



Resumen: marcadores moleculares con valor de p significativo

EGFR

EGFR

Sobreexpresión de *EGFR* en el 61% de GB

- Activador de la vía PI3K

iFISH test referencia

MLPA rápida, fácil, buen relación coste/efectividad

EGFRvIII

Esta presente específicamente hasta en un 34%

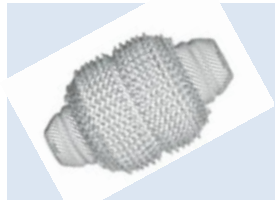
- Activador de la vía PI3K

Mayor frecuencia en los GB *EGFR* amp

Asociado al mal pronóstico

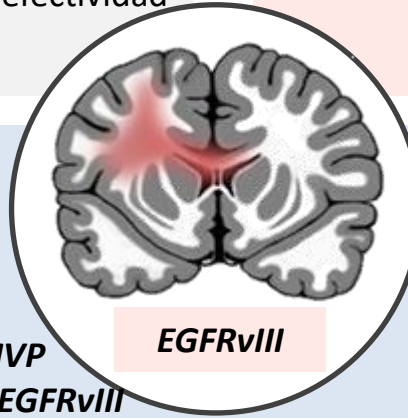
Atractiva diana terapéutica

Alteraciones asociadas EGFR



MVP

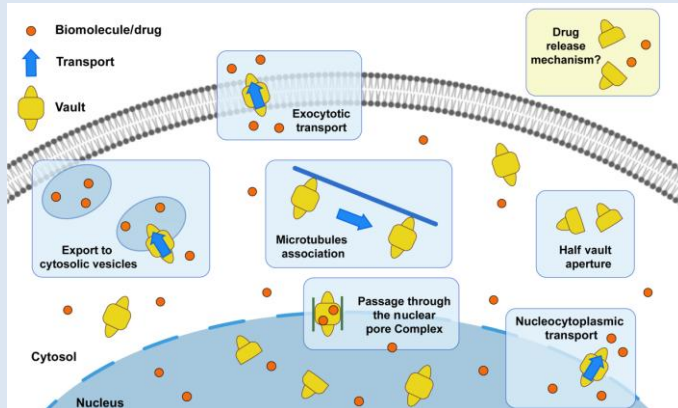
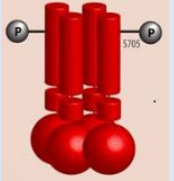
El 74% GB *EGFRvIII* tiene amplificado MVP
Contribución MVP mal pronóstico GB *EGFRvIII*
Interfiere tratamiento confiriendo resistencia



EGFRvIII

ADD3

Fuerte asociación *EGFRvIII* y la
deleción de *ADD3* en GB
- Progresión y migración celular
Asociado al mal pronóstico



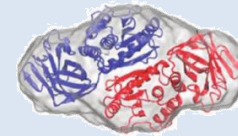
PTEN

Frecuente pérdida de *PTEN* en los GB

- Activador de la vía PI3K

El 68% de los *EGFRvIII* tiene deleción de *PTEN*

Relación significativa entre MVP y *PTEN*



Sci Adv. 2022;8(6):eabj7795

ALTERATION OF MAJOR VAULT PROTEIN IN HUMAN GLIOBLASTOMA AND ITS RELATION WITH *EGFR* AND *PTEN* STATUS

L. NAVARRO,^{a†} R. GIL-BENSO,^{a*†} J. MEGÍAS,^a
L. MUÑOZ-HIDALGO,^a T. SAN-MIGUEL,^a
R. C. CALLAGHAN,^a J. M. GONZÁLEZ-DARDER,^b
C. LÓPEZ-GINÉS^a AND M. J. CERDÁ-NICOLÁS^{a,c}

^a Department of Pathology, Universitat de València, Valencia, Spain

^b Department of Neurosurgery, Clinic Hospital, Valencia, Spain

^c Service of Pathology, Clinic Hospital, Valencia, Spain

Key words: epidermal growth factor receptor wild type (EGFRwt), epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII), glioblastoma (GBM), multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), major vault protein (MVP), phosphatase and tensin homolog (PTEN).

Cell Oncol.
DOI 10.1007/s13402-017-0329-5

ORIGINAL PAPER





Association between epidermal growth factor receptor amplification and ADP-ribosylation factor 1 methylation in human glioblastoma

Concha López-Ginés¹ • Lara Navarro² • Lisandra Muñoz-Hidalgo² • Enrique Buso³ • José Manuel Morales³ • Rosario Gil-Benso¹ • Mariela Gregori-Romero¹ • Javier Megías¹ • Pedro Roldán⁴ • Remedios Segura-Sabater² • José Manuel Almerich-Silla⁵ • Daniel Monleón^{1,2} • Miguel Cerdá-Nicolás¹



Article

Identification of New Genetic Clusters in Glioblastoma Multiforme: *EGFR* Status and *ADD3* Losses Influence Prognosis

Lara Navarro^{1,2,†} , Teresa San-Miguel^{1,3,*} , Javier Megías^{1,3}, Nuria Santonja², Silvia Calabuig^{1,4,5} , Lisandra Muñoz-Hidalgo¹ , Pedro Roldán⁶, Miguel Cerdá-Nicolás^{1,3,7} and Concha López-Ginés^{1,3}

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. **La MLPA demuestra ser una técnica eficaz en la detección de variaciones en el número de copias** de regiones concretas. Es rápida y fácil de interpretar para el estudio de muestras parafinadas. Sin embargo, sigue siendo necesario el uso del FISH si el objetivo es detectar niveles intermedios de amplificación/delección o poliploidías.
2. **La alteraciones de *EGFRvIII* y *PTEN* contribuyen a la agresividad del GB, y ambas situaciones se asocian con la amplificación del gen *MVP*.**
3. **El incremento en la expresión de *MVP* es un factor pronóstico independiente de peor respuesta clínica a la quimioterapia y/o supervivencia global.**
4. **Encontramos asociaciones estadísticamente significativas entre la amplificación de *EGFR* y/o *EGFRvIII*, y variaciones en el número de copias de *CDKN2A*, *MSH6*, *MTAP* y *ADD3*. Siendo tanto *EGFRvIII* como las pérdidas en *ADD3* marcadores independientes de mal pronóstico con significación significativa en nuestra serie.**

5. **Sugerimos que el uso de técnicas sencillas como la MLPA para evaluar la SCNA en *ADD3* y la variante *EGFRvIII* podrían ser consideradas para implementarlas en las rutinas de diagnóstico para adaptar mejor las decisiones clínicas como un factor pronóstico independiente y profundizar en la clasificación de los pacientes con GB.**

6. **Aplicando una metodología de clasificación de conglomerados jerárquicos a los resultados obtenidos del estudio de las variaciones en el número de copias, el estudio de la amplificación de *EGFR* y el estudio de la variante *EGFRvIII* hemos identificado tres grupos genéticamente diferentes (C1, C2 y C3) de glioblastomas. Estos grupos presentaron similitudes y diferencias en las alteraciones detectadas y en la vías afectadas.**

7. **Los tres grupos de GB (C1, C2 y C3) no presentan diferencias estadísticamente significativas en términos de supervivencia aunque sí una tendencia. Por ello, la clasificación por este método no constituiría por sí misma una herramienta suficientemente práctica para su utilización en el contexto clínico diario.**

8. **La metilación del promotor *ARF1* está relacionado significativamente con la amplificación del gen *EGFR*, el tráfico de vesículas, el recambio de membranas y el aumento del metabolismo tumoral. Por lo que este biomarcador podría ser un nuevo componente, en la cadena de eventos que conduce a la proliferación e invasión de células tumorales de GB.**



¡¡Gracias a tod@s!!

