

TESIS DOCTORAL

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



Departamento de Patología
Facultad de Medicina y Odontología

Lara Navarro Cerveró

Directores

Concepción López Ginés
Miguel Cerdá Nicolás



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

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

Lara Navarro Cerveró

Directores

Concepción López Ginés
Miguel Cerdá Nicolás

Tesis doctoral para optar al grado
de Doctor en Medicina

Programa de Doctorado 3139 Medicina:
Tumores del Sistema Nervioso Central
Departamento de Patología
Facultad de Medicina y Odontología

València, 25 de mayo de 2022

Doña Concepción López Ginés y Don Miguel Cerdá Nicolás, catedráticos de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València,

CERTIFICAN

Que la tesis doctoral presentada por Lara Navarro Cerveró, Licenciada en Ciencias Biológicas por la Universitat de València, con el título

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

reúne los requisitos para su lectura y obtención del grado de DOCTORA POR LA UNIVERSITAT DE VALÈNCIA en el PROGRAMA DE DOCTORADO DE MEDICINA.

Y para que así conste a los efectos oportunos, se firma el presente certificado en Valencia, el 25 de mayo de 2022.

Fdo.
Concepción López Ginés

Fdo.
Miguel Cerdá Nicolás

*La vida es una unión simbiótica
y cooperativa que permite
triunfar a los que se asocian*

Lynn Margulis

Agradecimientos

Después de tanto tiempo, por fin me encuentro escribiendo este apartado de la tesis, que para mí es importante porque este trabajo también es fruto del reconocimiento y del apoyo de las personas que nos quieren, sin las cuales no tendríamos la fuerza y energía que nos anima a crecer como personas y como profesionales. Gracias a todos.

En primer lugar me gustaría agradecer a mis directores la ayuda prestada, y, en particular, a Concha López, porque aunque el camino ha sido largo y complicado, gracias a su apoyo, este proyecto puede llegar a su fin. Gracias a ambos por transmitirme esa pasión por la ciencia.

A todos vosotros que de alguna forma habéis contribuido para que este trabajo sea posible: al equipo de personas, compañeros y amigos que me habéis acompañado del Laboratorio del Departamento de Patología de la Universitat de València, del Hospital Clínico Universitario de Valencia y del Hospital General Universitario de Valencia. Son tantas las personas que he conocido y a las que agradecer que estuvieran allí en los buenos y malos momentos, tanto personales como científicos, que para no olvidarme de nadie, tan solo os quiero decir a todos MUCHAS GRACIAS. Gracias por haber colaborado en este estudio y por demostrarme que no hay nada imposible. Espero que podamos seguir trabajando juntos mucho más tiempo.

A mi familia, a mis hermanos y en especial a ti mamá, por convertirme en quien soy hoy, por haberme educado en la cultura del esfuerzo y por demostrarme cada día que la VIDA es para los valientes. Gracias a mis amigos, que siempre me han prestado un gran apoyo moral y humano, necesarios en los momentos más difíciles.

Y por último a Pablo y Vega, porque han sido los que más de cerca han recorrido este camino conmigo. Por su apoyo incondicional, por su ayuda profesional y familiar infinita.

A todos, muchas gracias.

Resumen

En España, más de 4000 personas serán diagnosticadas anualmente con un tumor maligno cerebral que en su mayoría recaerá en el grupo que se denomina 'Gliomas Malignos'. Están clasificados de I a IV. La mayoría son glioblastomas (grado IV) (GB), siendo estos el tipo más agresivo. Se espera que la supervivencia media para los pacientes tratados con el protocolo estándar sea de alrededor de 15 meses. La esperanza de vida tan reducida se debe a que son tumores muy proliferativos y heterogéneos. Esto subraya la necesidad de buscar alternativas para mejorar su manejo.

Los estudios de esta tesis se centran en caracterizar biomarcadores y alteraciones genéticas en los diferentes estatus de presentación del *EGFR* que permitan abordar mejor el conocimiento de este tumor, así como confirmar su valor pronóstico o predictivo de respuesta al tratamiento. Los artículos I y II exploraron diferentes biomarcadores encontrando que la proteína *Major Vault Protein* (MVP) y el estado de metilación del factor de ribosilación de ADP 1 (ARF1) son marcadores que proporcionan información para comprender mejor los mecanismos moleculares que subyacen al comportamiento agresivo de los glioblastomas.

En el primer estudio (artículo I) investigo el papel de la expresión de la proteína MVP dentro de los diferentes estatus de presentación de *EGFR* y su relación con la presentación de *PTEN*. Así como su correlación con la resistencia a múltiples fármacos al reducir la acumulación celular de agentes quimioterapéuticos en pacientes con glioblastoma. Este estudio mostró que un incremento en la expresión de MVP es un factor pronóstico independiente de peor respuesta clínica a la quimioterapia y/o supervivencia global.

El propósito del segundo estudio (artículo II) fue caracterizar el estado de metilación de genes relevantes para el GB que estuvieran asociados con alteraciones del gen *EGFR*, y que pudieran ser considerados como

biomarcadores de mejor pronóstico. Se encontró una asociación significativa con una molécula implicada en el proceso de tráfico vesicular, el factor de ribosilación de ADP 1 (ARF1). Los resultados presentados en esta publicación proporcionan una base para una nueva hipótesis que conecta la amplificación del gen *EGFR* en células GB con la metilación del promotor del gen *ARF1*, el tráfico de vesículas, el recambio de membranas y el aumento del metabolismo tumoral. Los mecanismos subyacentes a estas conexiones y sus consecuencias funcionales quedan pendientes de establecer.

En el tercer estudio (artículo III) se analizaron las alteraciones del número de copias somáticas (SCNA), junto con la detección de *EGFRvIII* y la amplificación de *EGFR* en una serie de 137 pacientes con GB. Encontrando asociaciones estadísticamente significativas entre la amplificación de *EGFR* y/o *EGFRvIII*, y SCNA en *CDKN2A*, *MSH6*, *MTAP* y *ADD3*. Siendo tanto *EGFRvIII* como las pérdidas en *ADD3* marcadores independientes de mal pronóstico. La mayoría de estos genes se encontraban implicados en las principales vías de señalización de *EGFR*.

En conclusión, los resultados de estos estudios aportan nuevos conocimientos de alteraciones genéticas que probablemente están implicadas con los mecanismos que conducen al desarrollo del glioblastoma.

ÍNDICE

Agradecimientos	9
Resumen	11
Índice de tablas	15
Índice de figuras	17
Abreviaturas	19
Compendio de artículos que sustentan esta tesis	23
1. INTRODUCCIÓN	25
1.1. Presentación del glioblastoma. Epidemiología y anatomía patológica.	27
1.2. Clasificación actual de los gliomas infiltrantes: Organización Mundial de la Salud (OMS).	29
1.3. Características clínicas del GB	33
1.4. Pronóstico y tratamiento del GB.	34
1.5. Heterogeneidad genética en GB: intertumoral e intratumoral . . .	35
1.6. Principales alteraciones moleculares.	37
1.6.1. Mutaciones en los genes IDH1 e IDH2.	40
1.6.2. Alteraciones en el receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR).	43
1.6.2.1. Mutaciones de EGFR en GB	46
1.6.2.2. Amplificación de EGFR en GB	47
1.7. Vías de señalización del EGFR en GB	48
1.8. Otros marcadores moleculares en los gliomas: el promotor TERT, ATRX y mutaciones de TP53	52
1.9. Alteraciones del número de copias somáticas (SCNA) en GB . . .	53
1.10. Marcadores epigenéticos	54
1.10.1. Metilación del promotor de MGMT	55
1.10.2. El fenotipo metilador en islas CpG (G-CIMP).	58
1.11. Perfiles metabólicos en el glioblastoma.	61
1.12. Valor diagnóstico, pronóstico y terapéutico de las alteraciones moleculares	62
1.13. Clasificación basada en genoma, epigenoma y transcriptoma	65
2. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO Y OBJETIVOS.	67

3. RESULTADOS	71
3.1. Datos clínicos e histopatológicos	73
3.2. Alteraciones genéticas. Relación entre las diferentes variables moleculares y la supervivencia	75
3.2.1. Estudio de las mutaciones de IDH por secuenciación Sanger	75
3.2.2. Evaluación del estado de EGFR por iFISH, MLPA y qPCR	77
3.2.2.1. Amplificación del gen EGFR	77
3.2.2.2. Expresión del gen EGFR	78
3.2.2.3. Estudio de la presencia del mutante EGFRvIII por MLPA.	79
3.3. Biomarcadores basados en la caracterización de SCNA por MLPA	80
3.3.1. Variación en el número de copias de EGFR.	82
3.3.2. Variación en el número de copias de MVP	84
3.3.3. Variación en el número de copias de PTEN.	86
3.3.4. Variación en el número de copias de ADD3	87
3.4. EGFR y vías de señalización.	88
3.5. Clasificación genética de glioblastomas: distribución de los casos en subgrupos	90
3.5.1. Características moleculares de los tres subgrupos de GB	93
3.6. Alteraciones epigenéticas	95
3.6.1. Evaluación del estado de metilación del ADN y el estado de amplificación de EGFR	95
3.6.2. La metilación del promotor ARF1 se correlaciona con su expresión de ARNm	97
3.6.3. Amplificación de EGFR, metilación de ARF y perfiles metabólicos.	98
4. ARTÍCULOS	101
5. DISCUSIÓN	145
6. CONCLUSIONES	161
7. BIBLIOGRAFÍA.	165
Artículos como coautor no incluidos en esta tesis	194

Índice de tablas

- Tabla 1.** Clasificación de la OMS para tumores del SNC
- Tabla 2.** Características de los GB-IDHwt y GB-IDHm
- Tabla 3.** Resumen de subtipos de GB basado en análisis de estado de metilación y transcriptómica
- Tabla 4.** Principales alteraciones genéticas y su valor como biomarcadores diagnósticos y/o pronósticos
- Tabla 5.** Datos clínicos y estado mutacional de *IDH* de 137 pacientes con GB
- Tabla 6.** Resumen de las características moleculares más relevantes de 137 pacientes con glioblastoma
- Tabla 7.** Correlación del estado de *EGFR* y la delección de *PTEN* con la dosis del gen *MVP* estudiado por MLPA
- Tabla 8.** Análisis de agrupamiento (PCA) de GB-IDHwt

Índice de figuras

- Figura 1.** Clasificación de gliomas difusos, incluida la histología y la genética molecular
- Figura 2.** Heterogeneidad inter e intratumoral
- Figura 3.** Alteraciones moleculares en gliomas
- Figura 4.** Cambios genéticos secuenciales observados en la patogénesis de diferentes subtipos de Verhaak de GB
- Figura 5.** Esquema de las reacciones asociadas al TCA, especificando las nuevas funciones de las proteínas IDH1/2 mutadas
- Figura 6.** Estructura esquemática y dominios reguladores de *EGFR* y de la forma mutante EGFRvIII
- Figura 7.** Mecanismos de activación de receptores de la tirosina quinasa (RTK)
- Figura 8.** Principales alteraciones genéticas (naturaleza y frecuencia) en las tres vías de señalización más implicadas en el GB
- Figura 9.** Paisaje genómico del glioblastoma. Cariotipo digital que muestra las SCNA más comunes en el glioblastoma
- Figura 10.** Metilación de la citosina mediada por las DNA metiltransferasas (DMNTs), seguida de la hidroxilación de la 5mC mediada por miembros de la familia de proteínas a la que pertenece TET2
- Figura 11.** Mecanismo de acción de la proteína MGMT
- Figura 12.** Efectos celulares de niveles elevados de D2HG en células de glioma
- Figura 13.** Resumen de las principales clasificaciones moleculares de GB que orientan el diagnóstico, pronóstico y recomendaciones terapéuticas
- Figura 14.** Características histológicas del GB-IDH-wt
- Figura 15.** Resultados de IHQ para el marcaje con anti-EGFR en secciones incluidas en parafina
- Figura 16.** Patrones de amplificación de *EGFR* en GB analizado por *Hibridación fluorescente in situ*
- Figura 17.** Relación de la expresión ARNm de EGFR en GB con los tipos de amplificación encontrados por iFISH

- Figura 18.** Asociación de la presencia del mutante EGFRvIII con la SG
- Figura 19.** Alteraciones del número de copias somáticas (SCNA) de los GB analizados por MLPA
- Figura 20.** SCNA relacionados con el estado del gen *EGFR*
- Figura 21.** MVP inmunoexpresión según su nivel de amplificación, utilizando secciones incluidas en parafina
- Figura 22.** Relación entre las variaciones en el número de copias del gen MVP y la supervivencia
- Figura 23.** Relación entre la presencia o ausencia de delección de *PTEN* y los niveles de dosis génica de *MVP*
- Figura 24.** Asociación entre SCNA en *ADD3* y supervivencia global (SG)
- Figura 25.** Esquema de las vías de señalización estudiadas en GBs
- Figura 26.** Análisis de agrupamiento
- Figura 27.** Diagramas de caja que representan el nivel de metilación del promotor *ARF1* relacionado con diferentes niveles de amplificación de *EGFR* en GB y tejidos de control no neoplásicos
- Figura 28.** Mapa de calor de los niveles de metilación de las regiones CpG dentro del promotor del gen *ARF1*
- Figura 29.** Niveles de ARNm de *ARF1* medidos por qRT-PCR en comparación con diferentes patrones de metilación del promotor del gen *ARF1*
- Figura 30.** Perfiles metabolómicos de GB según el estado de amplificación del gen *EGFR*
- Figura 31.** Rutas definidas por el análisis de agrupamiento

Abreviaturas

α KG: α -Cetoglutarato

2-HG: 2-Hidroxiglutarato

5hmC: 5-hidroximetilcitosinas

5mC: 5-metilcitosinas

AI: Astrocitoma difuso grado II de malignidad de la OMS

AIII: Astrocitoma anaplásico (grado III de malignidad de la OMS)

ADD3: Del inglés *Adducin 3 (Gamma)*(gen)

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ALT: Del inglés *Alternative Lengthening of Telomeres*

AKT: Proteína kinasa B

ARF1: Del inglés *ADP Ribosylation Factor 1* (gen)

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ATR: Del inglés *ATR Serine/Threonine Kinase* (gen)

ATRX: Del inglés *α -Thalassemia/mental Retardation-syndrome-X-linked* (gen)

BCNU: Carmustina

CCNU: Lomustina

CDH1: Del inglés *Cadherin 1* (gen)

CDK6: Quinasa dependiente de ciclina 6

CDK4: Quinasa dependiente de ciclina 4

CDKN2A: Del inglés *Cyclin-*

dependent kinase inhibitor 2A (gen)

CDKN2B: Del inglés *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2B* (gen)

CC: Componente celular

Chr: Cromosoma

CIMP: Del inglés *CpG Island Methylator Phenotype*

CPC: Células propagadoras del cáncer cerebral

CpG: Citosina fosfo Guanina Del inglés *5'-C-phosphate-G-3'*

CSCs: Del inglés *Cancer Stem Cells*

DEGs: Genes con expresión diferencial

DMNTs: DNAmetilinas

DOCK8: Del inglés *Dedicator Of Cytokinesis 8* (gen)

EC: Extracelular

EGFR: Del inglés *Epidermal Growth -factor Receptor* (gen)

EGFRwt: Forma salvaje del gen *EGFR*

EGFRvIII: Mutación o forma delecionada variante III de *EGFR* (gen)

ERBB2: Del inglés *Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2* (gen)

FDR: Tasa de descubrimiento falso

iFISH: Hibridación fluorescente

in situ en interfase (del inglés *Interphase Fluorescence In Situ Hybridization*)

GFAP: Proteína fibrilar ácida glial

GI: Gliomas difusos o infiltrantes

GB: Glioblastoma

GB-IDHm: Glioblastoma con mutación de *IDH*

GB-IDHwt: glioblastoma sin mutación de *IDH*

H-amp: Alto nivel de amplificación

HIF: Factor inducible por hipoxia

G-CIMP: Del inglés *Glioma CpG Island Methylator Phenotype*

GSTP: Del inglés *Glutathione S-Transferase Pi 1* (gen)

HR-MAS: Resonancia Magnética Nuclear de Ángulo Mágico

IC: Intracelular

IDH: Isocitrato deshidrogenasa (IDH1 y IDH2) (gen)

IDH1: Del inglés *Isocitrate Dehydrogenase (NADP(+)) 1* (gen)

IDH2: Del inglés *Isocitrate Dehydrogenase (NADP(+)) 2* (gen)

IHQ: Inmunohistoquímica

IL4: Del inglés *Interleukin 4* (gen)

IRM: Imágenes de resonancia magnética

JAG1: Del inglés *Jagged*

Canonical Notch Ligand 1 (gen)

KDa: KiloDalton

KPS: Escala del Estado Funcional de Karnofsky (del inglés *Karnofsky Performance Status*)

KRAS: Del inglés *KRAS Proto-Oncogene, GTPase* (gen)

L-amp: Bajo nivel de amplificación

LOH: Pérdida de heterocigosidad (del inglés *loss of heterozigosity*)

MALDI-TOF: Del inglés *Matrix-assisted laser desorption/ionization Time Of Flight*

MDM2: Del inglés *MDM2 Proto-Oncogene* (gen)

MDM4: Del inglés *MDM4 Regulator Of P53* (gen)

MEN1: Del inglés *Menin 1* (gen)

MET: Receptor del factor de crecimiento de hepatocitos

MGMT: Del inglés *O-6-methyl-guanine DNA methyltransferase* (gen)

MLH1: Del inglés *MutL Homolog 1* (gen)

MLPA: Del inglés *Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification*

MP1: Patrón metilación 1

MP2: Patrón metilación 2

MP3: Patrón metilación 3

MSH6: Del inglés *MutS Homolog 6* (gen)

MS-MLPA: Del inglés *Methylation-Specific Multiplex Ligation-*

Dependent Probe Amplification

MS-PCR: PCR específica de metilación

MTAP: Del inglés *Methylthioadenosine Phosphorylase* (gen)

MVP: Del inglés *Major Vault Protein* (gen)

N-amp: No amplificación

NF1: Del inglés *Neurofibromin 1* (gen)

NFKB1: Del inglés *Nuclear Factor Kappa B Subunit 1* (gen)

NOS: Del inglés *Not Otherwise Specified*

NOTCH3: Del inglés *Notch Receptor 3* (gen)

OII: Oligodendroglioma (grado II) de malignidad de la OMS

OIII: Oligodendroglioma anaplásico (grado III de malignidad de la OMS)

OA: Oligoastrocitoma

OD: Oligodendroglioma

OMS: Organización Mundial de la Salud

OS: Del inglés *Overall survival*

PB: Procesos biológicos

PCCA: Del inglés *Propionyl-CoA Carboxylase Subunit Alpha* (gen)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés *Polymerase Chain Reaction*)

PCV: Procarbazona, lomustina y vincristina

PDGFRA: Del inglés *Platelet derived growth factor receptor A* (gen)

PIK3CA: Isoforma alfa de la subunidad catalítica de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato 3-quinasa

PI3K: Fosfoinositol 3-cinasa

PPI: Interacción proteína-proteína

PTEN: Del inglés *Phosphatase and Tensin homolog* (gen)

PBZ: Zona peritumoral del cerebro

PMV: Proliferación microvascular

QT: Quimioterapia

qRT-PCR: PCR cuantitativa

RB1: Proteína 1 asociada al retinoblastoma

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

RT: Radioterapia

RT-PCR: Del inglés *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*

SCNA: Alteraciones del número de copias somáticas

SD: Desviación estándar

SIX3: Del inglés *SIX Homeobox 3* (gen)

SG: Supervivencia global

SLP: Supervivencia libre de progresión

SMARCA4: Del inglés *SWI/SNF Related, Matrix Associated,*

Actin Dependent Regulator Of Chromatin, Subfamily A, Member 4 (gen)

SNC: Sistema Nervioso Central

SPG11: Del inglés *SPG11 Vesicle Trafficking Associated, Spatacsin* (gen)

STRING: Del inglés *The Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes*

TCA: Ciclo de los ácidos tricarboxílicos

TCGA: Del inglés *The Cancer Genome Atlas*

TK: Actividad tirosina quinasa

TM: Transmembrana

TNF: Factor de necrosis tumoral

TERT: Promotor del gen de la telomerasa

TET: Del inglés *ten-eleven translocation family protein*

TIC: Células iniciadoras de tumores

TIMP-3: Del inglés *TIMP metalloproteinase inhibitor 3* (gen)

TMA: Micromatriz de tejido

TMZ: Temozolomida

TTF: Terapia de campo de tumores. Del inglés *Tumor treating fields therapy*

TP53: Del inglés *Tumor protein p53* (gen)

WHO: Del inglés *World Health Organization*

Compendio de artículos que sustentan esta tesis

La presente tesis doctoral incluye tres trabajos originales publicados en revistas científicas indexadas en el Science Citation Reports, los cuales se detallan a continuación:

Alteration of major vault protein in human glioblastoma and its relation with *EGFR* and *PTEN* status.

Navarro L^{1*}, Gil-Benso R^{1*}, Megías J¹. Muñoz-Hidalgo L¹, San-Miguel T¹, Callaghan RC¹, González-Darder JM², López-Ginés C¹, Cerdá-Nicolás MJ^{1,3}.

***Equal collaboration to this work.**

Neuroscience. 2015 Jun 25; 297:243-51. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.04.005. Epub 2015 Apr 11. PMID: 25869624.

Impact factor 2015: 3.231

5-year impact factor: 3.343 (2015)

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

López-Ginés, C^{1*}, **Navarro, L**^{4.*}, Muñoz-Hidalgo, L⁴, Buso, E⁶, Morales, JM⁶, Gil-Benso, R¹, Gregori-Romero, M¹, Megías J¹, Roldán, P², Segura-Sabater, R⁴, Almerich-Silla, JM, Monleón, D^{1,4}, Cerdá-Nicolás, MJ¹.

***Equal collaboration to this work.**

Cell Oncol (Dordr). 2017 Aug;40(4):389-399. doi: 10.1007/s13402-017-0329-5. Epub 2017 Jun 19. PMID: 28631186.

Impact factor 2017: 1.574

5-year impact factor:1.184 (2017)

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

Navarro, L^{1,7,*}, San-Miguel, T^{1,4,*}, Megías, J^{1,4}, Santonja, N⁷, Calabuig, S^{1,8,9}, Muñoz-Hidalgo, L¹, Roldán, P², Miguel Cerdá-Nicolás^{1,4,3} and López-Ginés^{1,4}.

***Equal collaboration to this work.**

Cells. 2020 Nov 6;9(11):E2429. doi: 10.3390/cells9112429. PMID: 33172155.

Impact factor 2019: 4.366

5-year impact factor:5.276 (2019)

-
- (1) Department of Pathology, Universitat de València, Valencia, Spain.
 - (2) Department of Neurosurgery, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain.
 - (3) Service of Pathology, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain.
 - (4) INCLIVA Foundation, Valencia, Spain.
 - (5) Unidad Central de Investigación en Medicina, Universitat de València, Valencia, Spain.
 - (6) Departamento de Estomatología, Universitat de València, Valencia, Spain.
 - (7) Department of Pathology, Hospital General Universitario Valencia, Valencia, Spain.
 - (8) Molecular Oncology Laboratory, Fundación para la Investigación Hospital General Universitario Valencia, Valencia, Spain.
 - (9) Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer, Madrid, Spain.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Presentación del glioblastoma. Epidemiología y anatomía patológica

Las primeras referencias sobre el glioblastoma (GB) datan de 1863, cuando Virchow destacó el origen glial. En 1914, Mallory acuñó el término Glioblastoma Multiforme, que fue definitivamente aceptado por Bailey y Cushing en 1926, haciendo referencia a la heterogeneidad de la lesión y formar la base para la clasificación moderna de los gliomas.

Los gliomas son los tumores más comunes entre las neoplasias primarias del Sistema Nervioso Central. Además de la anterior clasificación histológica, estos tumores han sido agrupados, por la Organización Mundial de la Salud (OMS), de acuerdo con el grado de malignidad, en dos grandes grupos según el grado de infiltración del parénquima cerebral circundante: los gliomas difusos o infiltrantes (GI) y los gliomas focales o circunscritos¹. En la mayoría de los casos, los GI son irresecables y su historia natural se caracteriza por la recurrencia del tumor. Además, los gliomas de menor grado de malignidad tienden a progresar a un grado de mayor malignidad²⁻⁴.

El GB es el tipo de glioma de alto grado más frecuente (57,3 %), con una tasa de 3,22 casos por 100.000 habitantes, la mediana de edad al diagnóstico es de 65 años y la relación hombre/mujer de 1,4⁵. Es el glioma maligno con peor pronóstico en adultos, con una tasa de supervivencia a 5 años del 5 % y una mediana de supervivencia de 15 meses en pacientes tratados con el esquema estándar combinado de quimio y radioterapia⁵⁻⁶.

El glioblastoma es típicamente un glioma muy celular, que suele estar compuesto por células tumorales pobremente diferenciadas. En su forma más clásica, el GB se encuentra constituido por una población heterogénea de astrocitos neoplásicos de apariencia fibrilar y gemistocítico, con presencia de atipia nuclear, alta actividad mitótica y proliferación microvascular (PMV) con o sin necrosis. La necrosis se diferencia en

necrosis tipo infarto y/o necrosis con empalizada nuclear (anteriormente conocida como pseudoempalizada), en la que las células se agrupan alrededor del centro necrótico con el núcleo orientado hacia él^{7,8}.

El GB presenta un elevado índice mitótico con frecuentes mitosis atípicas, aunque esta actividad proliferativa puede variar de un caso a otro y entre diferentes regiones del mismo tumor. De hecho los valores descritos en la literatura varían entre el 15-20 %.

Como sugiere el término obsoleto "glioblastoma multiforme", la histopatología de este tumor es extremadamente variable, no solo por las diferentes zonas que se pueden observar, sino también por la gran variedad que hay de un caso a otro. Así pues, algunas lesiones muestran un alto grado de polimorfismo celular y nuclear con numerosas células gigantes multinucleadas, en contraposición con otros que son muy celulares pero relativamente monomórficos. La naturaleza astrocítica de las neoplasias es fácilmente identificable (al menos focalmente) en algunos tumores, pero difícil de reconocer en tumores poco diferenciados. La heterogeneidad regional del glioblastoma es notable, lo que dificulta el diagnóstico histopatológico en muestras limitadas, obtenidas mediante biopsias estereotáxicas.

El diagnóstico de glioblastoma a menudo se basa en el patrón tisular más que en la identificación de determinados tipos celulares. La presencia de células gliales altamente anaplásicas, la elevada actividad mitótica, la proliferación microvascular prominente y/o necrosis son características fundamentales para su diagnóstico.

La distribución de estas características clave dentro del tumor es variable, pero las grandes áreas necróticas generalmente ocupan el centro del tumor, mientras que las células tumorales viables tienden a acumularse en la periferia. Además, es característico una proliferación endotelial marcada con formación de nuevos vasos de localización habitualmente focal, pero suele ser más marcada alrededor de los focos necróticos y en la zona periférica de infiltración¹.

1.2. Clasificación actual de los gliomas infiltrantes: Organización Mundial de la Salud (OMS)

Clásicamente, los gliomas infiltrantes se han dividido en dos subtipos histológicos, según la célula de origen a la que se asemejan: los astrocitomas, con similitudes con los astrocitos, y los oligodendrogliomas (OD), con los oligodendrocitos. Entre ellos, se consideraba un tercer subtipo intermedio llamado tumor mixto u oligoastrocitario (OA). Dentro de estos subtipos la OMS, organismo encargado de la clasificación histológica de las neoplasias humanas, asigna un grado de malignidad del II al IV (no existen GI de grado I), ordenando los gliomas infiltrantes de menor a mayor agresividad. De este modo, hasta hace poco, dentro de los astrocitomas se consideraban tumores de alto grado el astrocitoma anaplásico (grado III) y el astrocitoma infiltrante grado IV o GB, siendo el astrocitoma difuso de bajo grado, el grado II. En el grupo de los OD se diferencian, de menor a mayor grado, el OD (grado II) y el OD anaplásico (grado III). No existen OD puros grado IV. El subtipo mixto, hasta el momento, se consideraba el OA como el tumor grado II y el OA anaplásico como grado III. El OA grado IV se identificó como un GB con componente oligodendroglioma⁹.

En la cuarta edición del año 2016 de la "Clasificación de tumores primarios del sistema nervioso central de la Organización Mundial de la Salud" se incorpora por primera vez, la necesidad de contar con marcadores de biología molecular para definir correctamente las entidades. En ella se clasifican algunos tumores según sus características histológicas (fenotípicas) y moleculares (genotípicas). Esto tiene implicaciones particularmente en el pronóstico, ya que se ha demostrado que en algunos tumores está mejor correlacionado con los marcadores moleculares que con el grado histológico.

Si nos referimos concretamente a los GI, los cambios más llamativos han sido: la desaparición como entidad del subtipo de los oligoastrocitomas (OA); la diferenciación de los GB, según una mutación de isocitrato deshidrogenasa (*IDH*), en GB con o sin mutación de *IDH*; y la descripción

de un nuevo subtipo, los gliomas difusos de la línea media, con mutación K27M en el gen relacionado con la histona H3. Estos tumores son clínicamente muy agresivos y corresponden a un grado IV¹.

Cuando no sea posible llevarse a cabo el diagnóstico molecular se hará la designación de NOS (del inglés *Not Otherwise Specified*).

En la Figura 1 y Tabla 1 se detallan la clasificación actual de los gliomas infiltrantes.

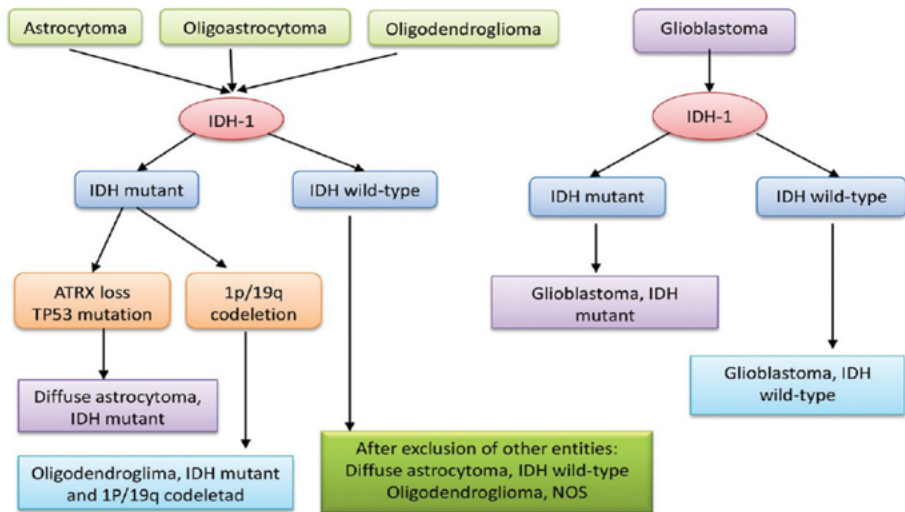


Figura 1. Clasificación de gliomas difusos, incluida la histología y la genética molecular. Reproducido de la referencia¹.

Así pues, actualmente, el estudio mutacional de los genes *IDH* (*IDH1* e *IDH2*) se considera básico para clasificar los gliomas infiltrantes, así como el análisis de la codelección de 1p/19q, ya que ambas son necesarias para el diagnóstico de los tumores oligodendrogliales (grado II y III). Por otro lado, aunque sin considerarse necesarias para el diagnóstico, en los gliomas infiltrantes las mutaciones de *ATRX* (alfa talasemia/mental Síndrome de retardo ligado al cromosoma X) y *TP53* (tumor protein p53) son características propias de la estirpe astrocitaria.

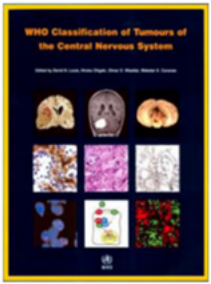
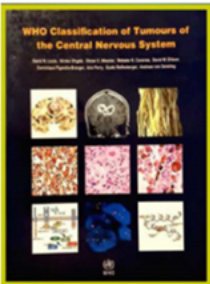
 WHO 2007	 WHO 2016
Astrocitoma difuso	Astrocitoma difuso IDH mutado Astrocitoma difuso IDH nativo Astrocitoma difuso, NOS
Astrocitoma anaplásico	Astrocitoma anaplásico IDH mutado Astrocitoma anaplásico IDH nativo Astrocitoma anaplásico, NOS
Glioblastoma	Glioblastoma IDH nativo Glioblastoma IDH mutado Glioblastoma, NOS
Oligodendroglioma	Oligodendroglioma IDH mutado y codeleción 1p/19q Oligodendroglioma, NOS
Oligodendroglioma anaplásico	Oligodendroglioma anaplásico IDH mutado y codeleción 1p/19q Oligodendroglioma anaplásico, NOS
Oligoastrocitoma	Oligoastrocitoma, NOS
Oligoastrocitoma anaplásico	Oligoastrocitoma anaplásico, NOS
No existía	Glioma difuso de línea media, H3 K27M mutado
Gliomatosis cerebri	Eliminado
Astrocitoma protoplásmico	Eliminado
Astrocitoma fibrilar	

Tabla 1. Clasificación de la OMS para tumores del SNC. Astrocitomas difusos y tumores oligodendrogiales. Reproducido de la referencia¹.

Las entidades que se distinguen actualmente, dentro de los astrocitomas infiltrantes, son el astrocitoma difuso grado II y el astrocitoma anaplásico (grado III) con o sin mutación de *IDH*. Los anteriormente llamados OA se reclasifican, según las alteraciones moleculares previamente explicadas, en OD o astrocitoma difuso. El GB, por su parte, se sigue considerando un astrocitoma difuso, aunque la presencia o no de mutación de *IDH* hace diferenciar dos grupos totalmente distintos, el GB con mutación de *IDH* (GB-IDHm) y el GB sin mutación de *IDH* (GB-IDHwt, del inglés *wild type*). Esta nueva clasificación hace que los términos clásicos de GB primario y secundario prácticamente puedan ser sustituidos por los de GB-IDHwt y GB-IDHm, respectivamente. En la Tabla 2 se resumen las diferencias más destacables entre esas dos entidades.

La clasificación de la OMS publicada en 2016 supuso un cambio en el abordaje del diagnóstico de los gliomas infiltrantes, ya que precisa tanto de los datos moleculares como de los datos histológicos para establecer el diagnóstico final o diagnóstico integrado. Este hecho obliga a los servicios de Anatomía Patológica a disponer en su cartera de servicios de un mínimo de determinaciones moleculares (codelección de 1p/19q, amplificación de *EGFR* (receptor del factor de crecimiento

	IDH-wild type glioblastoma	IDH-mutant glioblastoma
Nombre	Glioblastoma primario IDH salvaje	Glioblastoma secundario IDH mutado
Lesión precursora	No identificable. De novo	Astrocitoma difuso, Astrocitoma anaplásico
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 Cirugía + RT + QMT	9.9 meses 15 meses	24 meses 31 meses
Localización	Supratentorial	Preferentemente Frontal
Necrosis	Extensiva	Limitada
Mutaciones promotor TERT	72%	26%
Mutaciones TP53	27%	81%
Mutaciones ATRX	Rara	71%
Amplificación EGFR Mutaciones EGFRVIII	35%-60%	Rara
Mutaciones PTEN	24%	Rara

Tabla 2. Características de los GB-IDHwt y GB-IDHm. Reproducido de la referencia¹.

epitelial); detección de mutaciones que afectan a los genes *IDH1/2* o al promotor de transcriptasa reversa de la telomerasa (*TERT*) que conlleva a utilizar técnicas y procedimientos específicos, en el ámbito de la biología molecular, para la realización de dichos diagnósticos.

1.3. Características clínicas del GB

Como en muchas lesiones que afectan al SNC, la presentación clínica de los GB varía según la localización de la lesión. Los tumores generalmente se localizan en los hemisferios cerebrales, pero pueden encontrarse en cualquier parte del sistema nervioso central. En el caso de los GB las zonas de mayor frecuencia de presentación son los lóbulos frontal, temporal y parietal. Se caracterizan por un patrón infiltrativo de crecimiento y/o una tendencia a difundirse localmente dentro del SNC.

Los GB-IDHwt muestran una distribución anatómica muy variada, mientras que los GB-IDHm se asientan preferentemente en los lóbulos frontales¹.

Los GB pueden aparecer a cualquier edad, aunque son más frecuentes en la población adulta, el 70 % de los casos se presentan en pacientes de entre 45 y 70 años, y afectan a más hombres que mujeres: relación hombre/mujer se sitúa en torno a 1,6¹⁰. En los casos de GB-IDHm se encuentran con más frecuencia en pacientes de 45 años y menos, generalmente comienzan como astrocitomas de grado bajo o medio y la relación hombre/mujer es de 1,05¹¹.

Los signos y síntomas más frecuentes son la aparición de crisis comiciales, cambios en el comportamiento, déficits motores y síntomas secundarios derivados de la hipertensión intracraneal (náuseas, vómitos, dolores de cabeza...).

El GB se caracteriza por tener una historia clínica usualmente corta (aproximadamente 4 meses) y rápidamente progresiva, particularmente en los GB-IDHwt¹².

1.4. Pronóstico y tratamiento del GB

Con el tiempo se ha ido comprendiendo la necesidad de individualizar las recomendaciones de tratamiento para los pacientes con glioma, al igual que para los que padecen otras enfermedades malignas. La elección del tratamiento de los pacientes se debe realizar tanto en función de los factores pronósticos clínicos como de los marcadores biológicos, principalmente los relacionados con el propio tumor, y por último, pero no menos importante, las preferencias del paciente.

Los factores pronósticos clínicos reconocidos para los gliomas son la edad, el diagnóstico, el estado funcional (medido con el índice de Karnofsky o KPS) y el tipo de cirugía^{13,14}. El género suele ser un factor pronóstico, ya que a menudo se informa de que las mujeres tienen una mejor supervivencia¹⁵. En relación a los factores moleculares, y aunque existen muchos trabajos en la literatura que proponen un gran número de marcadores, los únicos factores con reconocida utilidad pronóstica en el GB son el estado de la metilación del promotor del gen O6-metilguanina-ADN metiltransferasa (*MGMT*) y las mutaciones de *IDH1/2*¹⁶.

Las modalidades de tratamiento disponibles para el glioma son la cirugía, la radioterapia (RT) y la quimioterapia (QT). En los últimos años, para el GB se ha añadido el tratamiento con campos eléctricos alternantes (TTF)¹⁷. El tratamiento estándar para el GB y el glioma de menor grado difiere en cuanto a la dosis de radioterapia, el momento y el tipo de quimioterapia.

Para todos los pacientes la cirugía debe ser la máxima resección tumoral segura. Las pruebas apuntan a que la cirugía radical conduce al mejor pronóstico y que la resección es mejor que la biopsia^{14,18-20}. A menudo, las consideraciones relativas al funcionamiento neurológico y a la calidad de vida pueden prohibir la extirpación completa del tumor. En los casos irreseccables, a veces solo es posible la biopsia, con fines de diagnóstico histológico y molecular definitivo, especialmente en pacientes con comorbilidades o tumores en zonas elocuentes. La

biopsia conlleva menos riesgos, pero no prolonga la supervivencia ni mejora los síntomas²¹.

La radioterapia es una parte esencial del tratamiento del glioma. Se administra en la zona del tumor, incluida la cavidad postoperatoria (volumen tumoral bruto), definida en la mayoría de los casos por imágenes de resonancia magnética (IRM). A esto se añade un margen de 1 a 2,5 cm (volumen objetivo clínico). La RT es un tratamiento local y su objetivo es contribuir al control local del tumor. Puede preservar la función y se ha demostrado que prolonga la supervivencia^{22,23}. El tiempo, el fraccionamiento y la dosis dependen del tipo de tumor y de los factores pronósticos, como la edad y el estado funcional del paciente²².

Los fármacos de quimioterapia más utilizados son los agentes alquilantes con buena penetración de la barrera hematoencefálica. Como son la temozolomida (TMZ), la carmustina (BCNU) y la lomustina (CCNU). Además, se pueden usar combinaciones de medicamentos, como la poliquimioterapia con PCV (procarbazona, CCNU, y vincristina). Estos tratamientos pueden reducir el tamaño del tumor o desacelerar su crecimiento, aliviar los síntomas, pero es muy poco probable que curen el tumor.

La terapia de campos de tumores (TTF) es una modalidad terapéutica relativamente nueva. Se basa en un dispositivo no invasivo, que se implanta en el cuero cabelludo, y que mediante la generación de campos eléctricos inhibe la replicación de las células cancerosas. Se ha demostrado que, *in vitro*, el tratamiento induce la muerte celular y reduce la migración y la invasión. Los campos eléctricos también tienen un efecto sobre las células tumorales resistentes a la TMZ y no metiladas²⁴.

1.5. Heterogeneidad genética en GB: intertumoral e intratumoral

El glioblastoma es una enfermedad mortal que no muestra signos de mejora a pesar del desarrollo de nuevas herramientas de diagnóstico

y terapias dirigidas innovadoras. Este sombrío resultado se relaciona principalmente con una compleja heterogeneidad intra e intertumoral debido a una alta inestabilidad genómica (Figura 2).

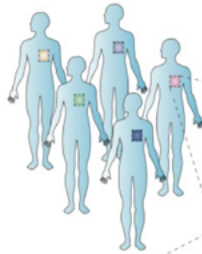
Descifrar la heterogeneidad y complejidad del GB es la clave para comprender su progresión y crear terapias efectivas.

En estrecha relación con otras neoplasias malignas, los GB son el producto de la acumulación de múltiples alteraciones genéticas y epigenéticas secuenciales que dan como resultado la **heterogeneidad intertumoral** observada en los GB.

En las células normales existe un equilibrio entre proliferación, diferenciación e inhibición del crecimiento en función de las necesidades de los tejidos. Si se altera este equilibrio se puede desarrollar un tumor. Los tumores son el resultado de un proceso de múltiples etapas, en el que se acumula un número creciente de cambios con el tiempo²⁵. Entre los factores genéticos que pueden dar lugar a la aparición y desarrollo del GB encontramos la activación de los genes que regulan la proliferación, denominados oncogenes (mutaciones de ganancia de función) y la desactivación de genes supresores de tumores (mutaciones de pérdida de función), así como alteraciones cromosómicas y una cierta predisposición genética a padecer esta enfermedad.

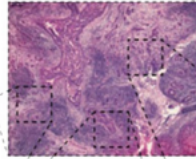
El estudio realizado por *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) en 2008 describió los diferentes eventos que impulsan la transformación maligna en el GB: como son las anomalías cromosómicas múltiples que alteran grandes segmentos del ADN, las sustituciones de nucleótidos y modificaciones epigenéticas que producen pequeños cambios que suelen afectar a un solo gen^{26,27}. De hecho, los GB revelan un cariotipo con múltiples aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales. Al igual que otras neoplasias malignas, el GB también se ve gravemente afectado por los SCNA, ya que hay una gran cantidad de genes importantes que se alteran debido a aberraciones

A. Heterogeneidad inter-tumoral Entre pacientes: Subtipos



B. Heterogeneidad intra-tumoral Dentro del tumor: Subclones

- Espacial
- Temporal



Dominance of clone 1



Dominance of clone 2



Mixed dominance

Figura 2. Heterogeneidad inter e intratumoral. La heterogeneidad inter e intratumoral de los fenotipos celulares puede dificultar el diagnóstico y la toma de decisiones terapéuticas. A) Heterogeneidad intertumoral; B) Heterogeneidad intratumoral²⁹.

en el número de copias que dejan una parte significativa del genoma muy distorsionado²⁷.

El proceso de **heterogeneidad intratumoral** (Figura 2) está asociado con la inestabilidad genómica tumoral y con el desarrollo de diferentes clones dentro del tumor. Este concepto se define como diferentes subpoblaciones celulares, o clones, que aparecen en un mismo tumor debido a la diferenciación de una o varias fracciones de células, al desarrollar éstas modificaciones moleculares diferentes a las que presentan el resto de células²⁸.

1.6. Principales alteraciones moleculares

En los últimos años ha habido una explosión de conocimientos sobre las alteraciones moleculares que subyacen al origen y la progresión de los tumores del sistema central.

Numerosos estudios multiómicos realizados en los últimos años, como los de *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), el *Chinese Glioma Genome Atlas* (CGGA) y otras bases de datos, demuestran que la integración de diferentes niveles de información ómica, revelan el complejo perfil genético de los GB^{27,30,31}.

Estos cambios moleculares, incluidas las mutaciones del gen *IDH1/2*, la amplificación del gen *EGFR*, mutaciones del gen *PTEN* (homólogo de fosfatasa y tensina), mutaciones de *TP53*, mutaciones del promotor del gen *TERT*, y mutaciones genéticas en *ATRX*, están obligando a los médicos a reconsiderar los enfoques del tratamiento convencional del GB^{30,32}.

Algunos eventos moleculares importantes y aberrantes promueven la transformación maligna del GB, destacando la importancia de la clasificación molecular (Figura 3). Primero, el GB tiene una amplia variedad de cambios cromosómicos, incluida la amplificación en el cromosoma 4 (Chr.4, *PDGFRA*), Chr.7 (*EGFR*; *MET*, receptor del factor de crecimiento de hepatocitos; *CDK6*, quinasa dependiente de ciclina 6), Chr.12 (*CDK4*, quinasa dependiente de ciclina 4; *MDM2*, homólogo de ratón doble minuto 2) y delección en Chr.10 (*PTEN*). En particular, algunos pacientes con GB tienen una ganancia simultánea de Chr.19 y 20³⁰.

En segundo lugar, el proyecto TCGA caracteriza las alteraciones somáticas en el genoma a través de herramientas de análisis genómicos como la secuenciación del genoma a gran escala, que proporcionan mutaciones significativas en GB, incluyendo: *TP53* (34,4 %), *EGFR* (32,6 %), *PTEN* (32 %), *NF1* (Neurofibromin 1, 13,7 %), *PIK3CA* (isoforma alfa de la subunidad catalítica de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato 3-quinasa, 12 %), *RB1* (proteína 1 asociada al retinoblastoma, 9,3 %), *ATRX* (6 %), *IDH1* (5,2 %) y *PDGFRA* (receptor A del factor de crecimiento derivado de plaquetas, 4,5%)^{27,33-35}.

En 2010, Verhaak y sus colegas utilizaron los datos *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) para correlacionar los subtipos de GB en función de

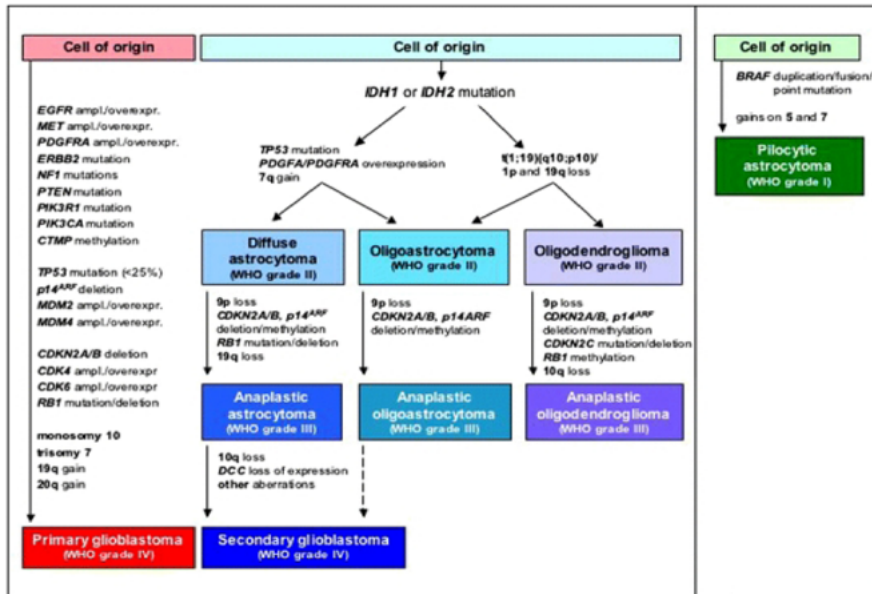


Figura 3. Alteraciones moleculares en gliomas. Resumen de las alteraciones moleculares más frecuentes en gliomas astrocíticos, oligodendrogliomas y oligoastrocitomas⁴⁷.

combinaciones específicas de perfiles moleculares y expresión génica (cambios en las secuencias de ADN y el número de copias). Según estos perfiles, los GB se pueden estratificar en cuatro subgrupos de GB: Proneural, Neural, Clásico (o proliferativos) y Mesenquimal. En la Figura 4 se enumeran las diferentes características principales y conexiones moleculares de cada subtipo molecular.

Esta clasificación podría tener relevancia pronóstica y predictiva, ya que cada subgrupo tiene un perfil de número de copias característico, una respuesta diferente a la terapia y además varía la supervivencia. Estas diferencias deberían tenerse en cuenta a la hora de diseñar la terapia específica para cada paciente. Sottoriva et al. mostraron que, en seis de cada diez casos, los fragmentos del tumor se clasificaban en al menos dos subgrupos distintos de GB³⁶.

Además, se cree que el GB contiene una pequeña población de células madre cancerosas (CSCs) que son capaces de autorrenovarse y que

pueden diferenciarse en diferentes tipos de células tumorales: neuronal, macroglial y mixto neuronal/astroglial³⁸. Tanto la heterogeneidad intratumoral como la existencia de estas CSC pueden explicar las complicaciones en la validación de biomarcadores oncológicos. Esto puede incluso contribuir a la selección incorrecta de pacientes para la terapia dirigida, al fracaso del tratamiento, a la resistencia a los fármacos y a la alta tasa de recurrencia del GB^{36,39}.

Finalmente, la metilación del ADN es un factor clave a la hora de medir la heterogeneidad y estratificación de los pacientes con GB. Las modificaciones epigenéticas del GB están asociadas con características biológicas y se consideran dianas terapéuticas⁴⁰⁻⁴³.

El estado de metilación del ADN en GB se correlaciona con la supervivencia, un hecho que se ha explorado ampliamente durante los últimos años^{40,41,44,45}. Los datos de metilación de GB en todo el genoma revelan subtipos biológicamente distintos³⁰. La metilación del ADN del promotor del gen *MGMT* ocurre en el 48,5% de los pacientes con GB (174/359); *MGMT* es un marcador bien conocido para la estrategia de tratamiento³³. Además, los datos de pacientes con GB indican otros genes metilados⁴⁶.

1.6.1. Mutaciones en los genes IDH1 e IDH2

El descubrimiento en el año 2008 de mutaciones puntuales en los genes de la isocitrato deshidrogenasa 1 y 2 (*IDH1/2*) mediante la secuenciación de nueva generación (NGS) en los glioblastomas³³ y, poco después, también en los gliomas difusos de menor grado⁴⁸⁻⁵¹, ha sido uno de los principales impulsores de la clasificación de los gliomas difusos sobre una base molecular. Las mutaciones *IDH1/2* se encontraron con baja frecuencia en los glioblastomas, pero con una frecuencia mucho mayor en los astrocitomas difusos de grado II y III de la OMS, los oligodendrogliomas y los oligoastrocitomas. Los glioblastomas con mutaciones en *IDH1/2* se consideraron posteriormente como glioblastomas "secundarios" originados a partir de dichos gliomas difusos de grado inferior, y los glioblastomas de tipo IDH salvaje como

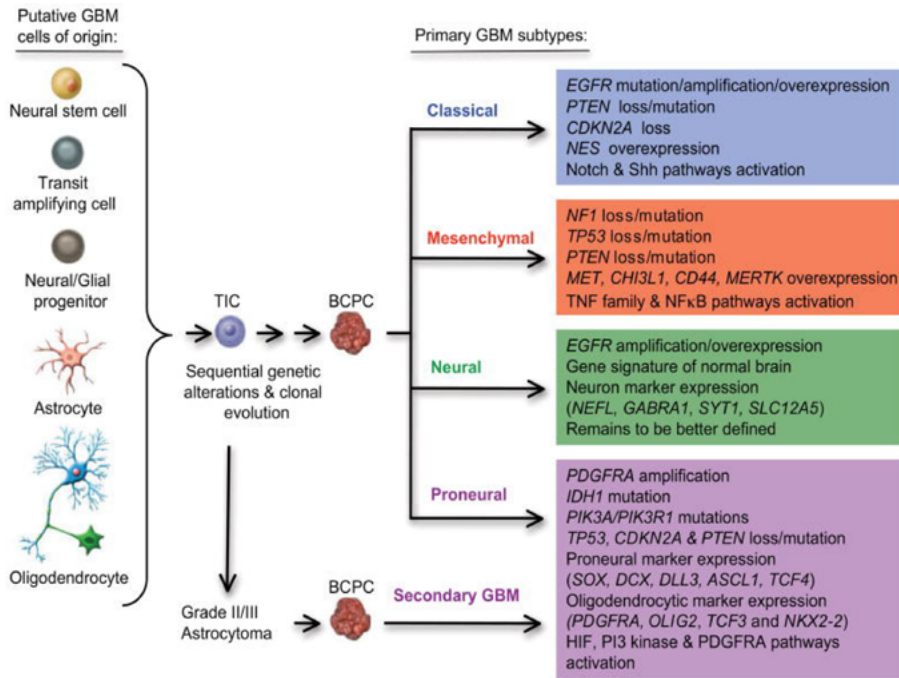


Figura 4. Cambios genéticos secuenciales observados en la patogénesis de diferentes subtipos de Verhaak de GB. Algunas células del cerebro normal sufren alteraciones genéticas, lo que da lugar a una población de células iniciadoras de tumores (TIC), que a continuación pueden acumular cambios genéticos y epigenéticos y convertirse en células propagadoras del cáncer cerebral (CPC). Estas últimas células son las responsables de la formación del GB (adaptada de Meir³⁷).

glioblastomas “de novo” o “primarios”^{33,49,52}. Los pacientes con un glioblastoma con mutación *IDH* (GB-*IDHm*) mostraron, por lo general, una supervivencia global sustancialmente más larga que los que tenían un glioblastoma de tipo *IDH* salvaje (GB-*IDHwt*)³³. Este impacto pronóstico de la mutación *IDH* se confirmó posteriormente para los gliomas difusos de grado II y III de la OMS⁴⁸⁻⁵¹. De hecho, el impacto de la mutación *IDH* en la supervivencia fue tan pronunciado que la supervivencia global de los pacientes con astrocitoma anaplásico de tipo *IDHwt* (grado III de la OMS) fue peor que la de los pacientes con glioblastoma con mutación *IDH* (grado IV de la OMS)⁵³. Se considera que las mutaciones de *IDH* son el evento iniciador de la oncogénesis de los gliomas con mutación de *IDH*⁵⁴.

Se cree que las mutaciones de *IDH1/2* (en el cromosoma 2q y en el 15q respectivamente) son un acontecimiento temprano⁵⁵ que implica un cambio de la arginina 132 por una histidina en el 80-90% de los tumores *IDH1* mutados (p.R132H) y un cambio de la arginina 172 en *IDH2* que puede ser sustituida por una lisina en el 2-3% de los casos de *IDHm* (p.R172K). Estas mutaciones son mutuamente excluyentes. Se producen otras mutaciones que pueden dar lugar a otros cambios de aminoácidos pero son poco comunes.

La función normal de las enzimas *IDH1/2* es catalizar la conversión de isocitrato en α -cetoglutarato (α KG) en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA). Mientras que *IDH1* se localiza en el citosol y en los peroxisomas, *IDH2* se localiza en la membrana mitocondrial interna. El producto génico *IDH1/2* mutado obtiene una actividad enzimática neomórfica, que conduce a la formación de un oncometabolito, el D-2-hidroxi-glutarato (2HG) y la correspondiente reducción de α KG. p.ej. inhibe las histonas desmetilasas y la actividad de las enzimas TET, que normalmente catalizan el primer paso en el proceso de desmetilación del ADN, lo que influirá en la epigenética celular y la metilación del ADN en todo el genoma.

Como consecuencia, el glioma mutado en *IDH* está fuertemente asociado con el fenotipo metilador de islas glioma-CpG (G-CIMP)⁵⁶. Se cree que una forma de las mutaciones de *IDH* para contribuir a la tumorigénesis es a través de la inhibición de las enzimas TET (*ten-eleven translocation family protein*) que reconocen citosinas metiladas y las oxidan a 5hmC (5-hidroximetilcitosinas). No se conoce totalmente el papel de las 5hmC, pero parecen estar involucradas en la activación de la desmetilación del ADN y, por tanto, en la activación de la expresión génica⁵⁵. 2HG también inhibe la diferenciación normal al inactivar las metilaciones de importantes promotores de genes (Figura 5).

La determinación de la mutación de *IDH* se puede realizar por secuenciación génica (Sanger o pirosecuenciación) o mediante

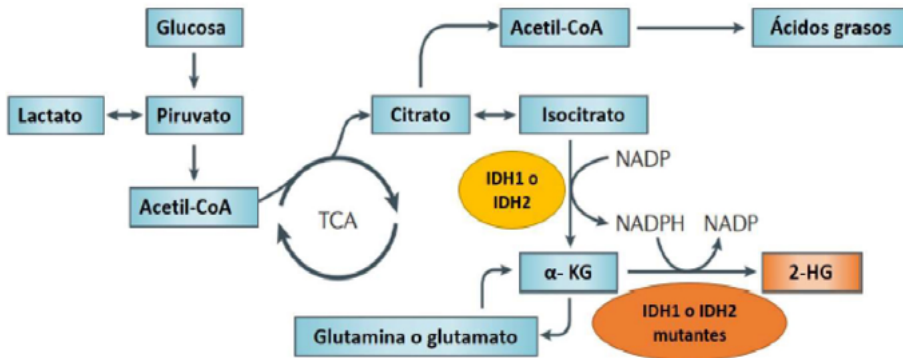


Figura 5. Esquema de las reacciones asociadas al TCA, especificando las nuevas funciones de las proteínas de IDH1/2 mutadas. En su forma nativa IDH1 e IDH2 (en amarillo) convierten el Isocitrato en α -KG produciendo NADPH a partir de NADP. IDH1 e IDH2 mutadas (en naranja) utilizan ese NADPH producido para convertir el α -KG en 2-HG⁵⁷.

la tecnología PCR real-time (Kit theascreen IDH1/2 RGQ PCR, Abbott RealTime IDH1). Además, es posible detectarla por métodos inmunohistoquímicos (IHQ), ya que existen varios anticuerpos específicos de la mutación que permiten una detección muy fiable de la proteína IDH1 R132H (la forma mutada más frecuente)^{53,58,59}.

1.6.2. Alteraciones en el receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR)

La alteración genética más común descrita en el GB es la amplificación en el receptor para factor de crecimiento epidérmico (EGFR), una glicoproteína transmembrana que regula la proliferación, la diferenciación y la supervivencia celular. Como se encuentra prácticamente limitada a los gliomas infiltrantes de alto grado se considera como un marcador primario en la patología de este tumor^{12,60-62}.

El gen *EGFR*, ubicado en 7p11-13, codifica una proteína transmembrana, que se activa clásicamente a través de la unión de ligandos extracelulares como son el factor de crecimiento epidérmico y transformante alfa (EGF, TGF- α) y es el responsable de la comunicación y transmisión de su señalización dentro de la célula⁶³.

EGFR tiene un peso molecular de 170 kDa y está codificado por un gen que está compuesto por 28 exones. El receptor maduro es una glicoproteína integral de membrana de 1186 aminoácidos con tres regiones principales: la extracelular (EC), la transmembrana (TM) y la intracelular (IC), esta última con actividad tirosina quinasa (TK) (Figura 6). La región EC se puede dividir en cuatro dominios, dos dominios de unión a ligando (L1 y L2) y dos dominios ricos en cisteína CR1 y CR2, poseedores de sitios de N-glicosilación, que forman los puentes disulfuro necesarios para definir la configuración adecuada del sitio de unión del ligando (el dominio CR1 contiene el brazo de dimerización). En la región IC se localiza el dominio tirosina quinasa (TK) y la región reguladora (REG), que incluye sitios de autofosforilación y el dominio de internalización⁶⁴.

Es necesaria la dimerización o la oligomerización del receptor para que presente actividad quinasa, desencadenando cascadas de señalización intracelular fundamentales en el funcionamiento celular (Figura 7A).

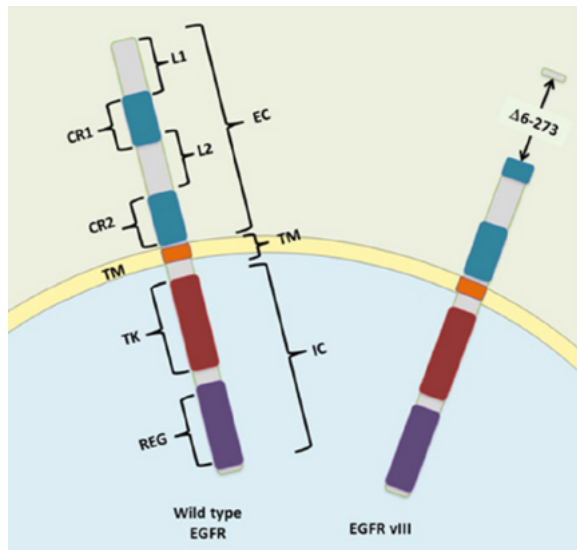


Figura 6. Estructura esquemática y dominios reguladores de EGFR y de la forma mutante *EGFRvIII*. El receptor salvaje consta de las regiones extracelular (EC), transmembrana (TM) e intracelular (IC). A la derecha el receptor mutante *EGFRvIII* carece de los aminoácidos 6 a 273 y no puede formar el sitio de unión al ligando⁶⁴.

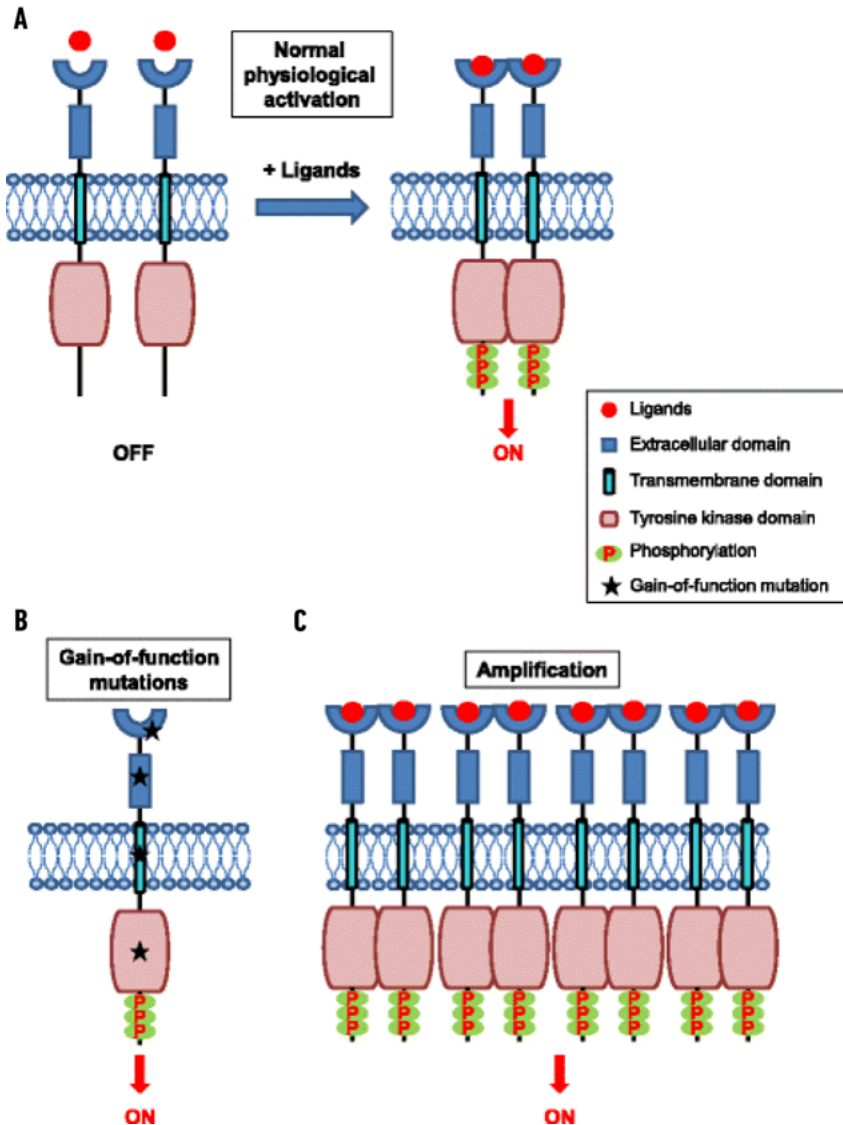


Figura 7. Mecanismos de activación de los receptores de la tirosina quinasa (RTK). **(A)** Representación esquemática de la activación de RTK en fisiología normal. Las RTK se activan mediante la formación de dimerización intermolecular en presencia de ligandos, lo que da como resultado la activación de la quinasa y la fosforilación de la cola C-terminal del receptor. **(B)** Representación esquemática de posibles mutaciones de ganancia de función en los diversos subdominios de un RTK. Las mutaciones conducen a la activación constitutiva del RTK, típicamente en ausencia de ligando. **(C)** La sobreexpresión de RTK, a menudo como resultado de la amplificación genómica del gen RTK, conduce a una mayor concentración local de receptores⁶⁵.

Cuando el ligando no está presente, el dominio EC se repliega sobre sí mismo. En presencia de ligando, la dimerización se consigue por la interacción del dominio L2 de la región extracelular con un ligando produciendo un complejo ligando-receptor uniéndose a otra copia del receptor a través de los dominios CR. La dimerización puede ser entre dos receptores idénticos (homodimerización) o entre diferentes miembros de la misma familia (heterodimerización). Al producirse se juntan dos copias del dominio tirosina quinasa (TK) que ahora pueden fosforilarse entre sí en los residuos de tirosina en la REG.

Este proceso depende de la unión del ligando, aunque también puede ocurrir cuando hay alteraciones estructurales del receptor y sobreexpresión. Esta proteína al estar alterada, presenta una activación constitutiva de su actividad fosforilativa (Figura 7B,C) ^{65,66}.

1.6.2.1. Amplificación de EGFR en GB

Diferentes autores estiman que el *EGFR* se encuentra amplificado en un 40-50 % de los GBs y sobreexpresado en un 50% de los tumores aproximadamente^{67,68}. Sin embargo, algunos autores amplían este rango hasta el 73%^{60,69}. Estas diferencias se deben a las diferentes metodologías utilizadas para su análisis.

La amplificación génica supone la duplicación de ciertas regiones del DNA que conducen a la existencia de múltiples copias de un gen. La identificación de amplificaciones de este marcador suele analizarse mediante la técnica de hibridación fluorescente in situ (FISH). No se recomienda el estudio del aumento de la expresión de la proteína (EGFR) por inmunohistoquímica porque, a menudo, los resultados son difíciles de interpretar y porque no existe una buena correlación entre la expresión proteica y el resultado del FISH^{70,71}.

Con la ayuda de la técnica de FISH se han podido identificar diferentes niveles de amplificación de *EGFR* en GB. Considerando el número de copias y el tipo de amplificación de *EGFR* se han podido dividir estos tumores en tres grupos: GBs con un alto nivel de amplificación (H-amp),

con un gran número de copias del gen por núcleo; GBs con un bajo nivel de amplificación (L-amp), con un pequeño número de copias por núcleo y un porcentaje pequeño de células afectadas; y GBs sin amplificación de *EGFR* (N-amp)^{60,72,186}.

Los estudios acerca de su relevancia pronóstica en los GB es un tema muy debatido, aunque la mayoría de los autores coinciden en que no parece constituir un factor pronóstico, quizás debido a su estrecha relación con el propio diagnóstico de GB^{73,74}. Algunos trabajos han sugerido que el potencial pronóstico del *EGFR* depende de la edad, asociado con peores datos de supervivencia en pacientes más jóvenes y con un buen pronóstico en pacientes de edad avanzada⁷⁵⁻⁷⁹. Además está presente en el 26% de los pacientes que sobreviven a largo plazo (más de 36 meses)⁸⁰, lo que sugiere que se trata de una vía oncogénica no mucho más agresiva que otras alteraciones características de los GBs.

1.6.2.2. Mutaciones de *EGFR* en GB

Muchos de los GBs con *EGFR* amplificado también tienen reordenamientos génicos, lo cual repercute en una considerable variedad de alteraciones cualitativas y estructurales del receptor, que se ven favorecidas por las diferentes mutaciones que puede sufrir el gen⁸¹⁻⁸⁴.

La alteración más frecuente es la delección de *EGFRvIII* y representa el 67% de los tumores con *EGFR* amplificado^{27,35,85}. Se caracteriza por delecciones de los exones 2 a 7 del dominio EC^{64,86} y codifica un receptor deficiente para los aminoácidos 6 a 273, con una nueva conformación terciaria en el dominio EC⁸⁷. *EGFRvIII* codifica para un receptor con un peso molecular de 140 KDa que se expresa o no junto al normal de 170 KDa^{77,86} (Figura 6).

La expresión de *EGFRvIII* es un factor independiente de mal pronóstico⁷⁷ e induce resistencia a fármacos^{88,89}. De manera similar, la expresión de *EGFRvIII* en pacientes con GB ocurre casi exclusivamente junto con la amplificación de *EGFR*⁸⁷, lo que indica una comunicación entre el receptor

mutante y el salvaje en las células tumorales que regula la acción oncogénica de ambos receptores^{90,91}.

Se ha propuesto que el impacto oncogénico de *EGFRvIII* se debe a su actividad quinasas constitutiva presente principalmente en forma de dímero⁹². De hecho, está implicado en la capacidad de activar de forma selectiva y/o constitutiva las rutas que incluyen las vías de señalización a PI3K^{93,94}, Ras-MAPK⁹⁵, NF- κ B (Nuclear factor *Ras*-MAPK kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), entre otras⁹⁶. La sobreexpresión de estas vías se asocia a mal pronóstico, ya que son las rutas de transducción de señales que regulan la proliferación celular^{97,98}.

Para la detección de la variante *EGFRvIII*, se puede realizar mediante la técnica de transcripción reversa seguida de PCR (RT-PCR), mediante MLPA (*Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification*) o se puede analizar su expresión por IHQ utilizando anticuerpos específicos⁹⁹. Según algunos autores, la correlación entre estas dos aproximaciones es aceptable¹⁰⁰.

1.7. Vías de señalización del EGFR en GB

La comprensión del panorama genético del GB desde un enfoque integrado gracias a estudios como los obtenidos por *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) reafirmó un concepto ya conocido desde hace tiempo de que la mayor parte de las alteraciones moleculares se encuentran principalmente en tres vías de señalización críticas en el GB: la inactivación de las vías del retinoblastoma (RB) y del supresor tumoral p53 y la activación de la vía RTK/Ras/PI3K²⁷.

En 2008 el TCGA publicó los resultados del análisis genómico (en términos de alteraciones en la secuencia y la metilación génica, así como en el número de copias de ADN) de 206 casos de GB gracias a la secuenciación masiva³². En este estudio se vio que estas vías se ven alteradas con una frecuencia de 78%, 87% y 88% de las muestras respectivamente, tanto en mutaciones como en la aberración del número de copias³². En

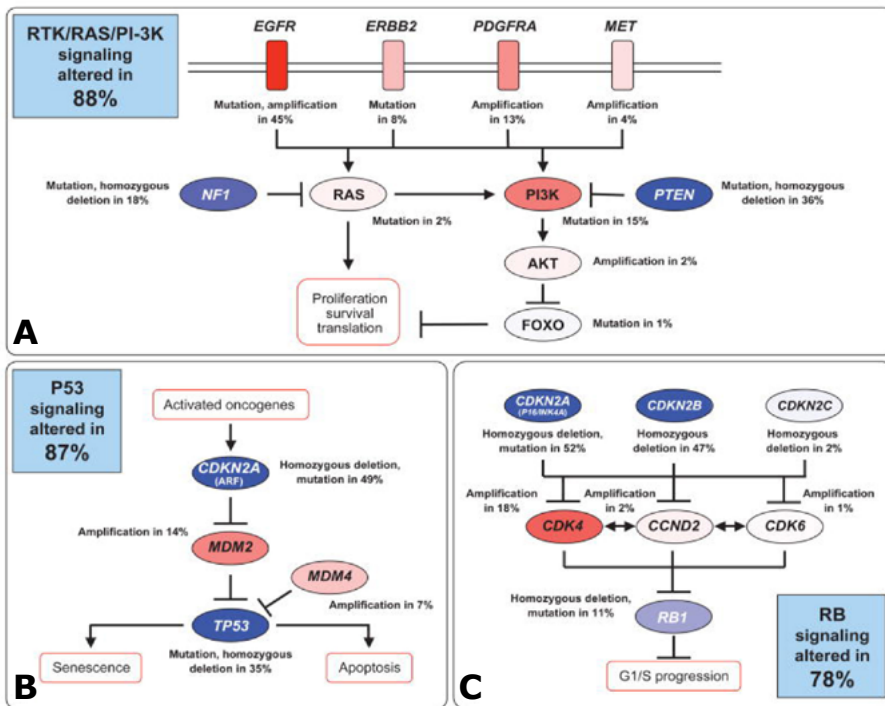


Figura 8. Principales alteraciones genéticas (naturaleza y frecuencia) en las tres vías de señalización más implicadas en el GB. Se muestran mutaciones, deleciones y amplificaciones en las vías de señalización **(A)** RTK/Ras/PI3K, **(B)** p53 y **(C)** RB. El rojo indica la activación de alteraciones genéticas (mutaciones y amplificaciones). Por el contrario, el azul indica alteraciones inactivantes, los tonos más oscuros corresponden a un mayor porcentaje de alteración. Para cada componente alterado de una vía particular, se indica la naturaleza de la alteración y el porcentaje de tumores afectados. Reproducido de *The Cancer Genome Atlas Research Network*²⁷.

cada vía de señalización los diferentes componentes muestran distintas frecuencias y diferentes tipos de alteraciones. La Figura 8 ilustra una vista esquemática de las tres vías.

Estos datos se ampliaron a una serie de casos mayor (543 GB) con resultados similares³⁵.

La vía más alterada, la vía RTK/Ra/PI3K, está implicada en la activación de la familia RTK de algunos factores de crecimiento. Entre ellos el EGFR, PDGFR α y MET desempeñan un papel importante en GB.

El *EGFR* se amplifica en el 45% de los casos y se asocia con un mal pronóstico. Aproximadamente la mitad de estos casos amplificados también tienen mutaciones de *EGFRvIII*, que se asocian con un peor pronóstico en comparación con el *EGFR* de tipo salvaje¹⁰¹. La señalización de PDGF en el glioblastoma se activa principalmente por la amplificación de *PDGFRA* (13% de los casos) o la regulación al alza de los ligandos. La activación de c-Met ocurre en alrededor del 4% de los glioblastomas y especialmente en muestras con una mediana de supervivencia más corta. También mostró una asociación con la activación de *EGFR/EGFRvIII*¹⁰¹.

Los factores de crecimiento descritos anteriormente median su efecto sobre las células del GB a través de varias vías de señalización. En el 85% de los GB, la vía PI3K/AKT está normalmente activada y está implicada principalmente en la proliferación celular⁹³ y la inhibición de apoptosis¹⁰², y la vía Ras/MAPK, con funciones en la proliferación y progresión del ciclo celular. La activación de PI3K en los GB ocurre a través de una variedad de mecanismos, los más comunes son la amplificación y/o sobreexpresión de *EGFR* y la pérdida de función de *PTEN* (regulador negativo de la actividad PI3K), que se encuentra deletado en el 36% de los tumores y con actividad disminuida en el 80% de los GB estudiados³³. *PTEN* es un supresor de tumores y una de sus funciones es desfosforilar de PIP3, evitando así la activación de AKT y mTOR¹⁰³. A través de esta función, *PTEN* es esencial para inhibir la proliferación celular y regular la migración e infiltración celular¹⁰⁴. La pérdida de la función de *PTEN*, debido a modificaciones genéticas o epigenéticas, es un componente común de la vía de activación de *AKT/PI3K mTOR* en cáncer.

Otros mecanismos como la expresión de la variante *EGFRvIII* o las mutaciones activantes en *PI3K* son menos frecuentes. De acuerdo con los datos más recientes, las mutaciones activantes en la subunidad reguladora o catalítica de *PI3K* se encuentran solo en el 8-15% de los GB.

La activación de la vía de *PI3K* da lugar a la activación de moléculas posteriores como AKT¹⁰³, que a su vez facilitará la activación de otras

vías como *NFKB* o *mTOR* que activarán la transcripción de muchos genes implicados en la proliferación, supervivencia, invasión y angiogénesis de estos tumores^{105,106}. Por otro lado, se ha demostrado que la hiperactivación de *PI3K* y *AKT* se asocia con menor capacidad de apoptosis, un aumento de la resistencia al tratamiento y una disminución de la supervivencia en pacientes con GB. Por lo tanto, parece que los gliomas malignos, en general, y los GB, en particular, dependen más de esta ruta de supervivencia que los gliomas de bajo grado¹⁰⁵.

Los factores de crecimiento también median sus efectos a través de la ruta *Ras-MAPK*¹⁰⁷, que también se ha descubierto que está potenciada en los gliomas malignos, donde parece desempeñar un papel importante en la proliferación¹⁰⁸. De manera similar, los estudios de la TCGA más recientes identificaron mutaciones o deleciones en *NF1* (neurofibromina 1) que es un regulador negativo de la ruta *Ras/MAPK*, en el 18% de los GB estudiados³².

Los datos del TCGA confirman que el 87% y 78% de los GB tienen inhibición de la función de las rutas p53 y Rb respectivamente, tanto para mutaciones como para aberraciones en el número de copias³².

Las alteraciones reflejadas en la vía de RB1 incluyen mutaciones y deleciones de *CDKN2A/p16* (52%), amplificación de *CDK4* (18%), *CDK6* menos frecuente (1%) y mutaciones/deleciones de RB1 (11%).

En la vía de señalización de p53 los cambios más frecuentes incluyeron mutaciones y deleciones de *CDKN2B/ARF* (49%), mutaciones en *TP53* (35%) y amplificación de *MDM2* (14%) y *MDM4* (7%)^{1,35,109}.

Por lo tanto, la alteración de las vías p53/MDM2/MDM4/p14ARF, que están implicadas en la activación de genes del ciclo celular, la reparación del ADN y la apoptosis, y de la vía p16INK4a/CDK4/Rb, que también controla el ciclo celular y el proceso de senescencia parecen desempeñar un papel importante durante el proceso de gliomagénesis.

Actualmente, no hay una secuencia definida de eventos que inevitablemente conduzcan al desarrollo de GB. Cualquier número o combinación de estas vías puede contribuir a la formación de GB. Aunque estas vías están bien definidas, el nivel de complejidad del GB se ve reforzada por los altos niveles de variabilidad, tanto entre diferentes tumores, como dentro del mismo tumor.

1.8. Otros marcadores moleculares en los gliomas: el promotor TERT, ATRX y mutaciones de TP53

La mayoría de los tumores oligodendrogiales con *IDH* mutado y codeleción 1p/19q tienen mutaciones activadoras en la región promotora del gen *TERT*¹¹⁰⁻¹¹², lo que convierte a esta aberración genética en un valioso marcador diagnóstico en el contexto adecuado. El aumento de la actividad de la telomerasa facilita la inmortalidad celular y promueve la oncogénesis.

Sin embargo, estas mutaciones también ocurren con frecuencia en los GB-IDHwt, con un aumento de la actividad de la telomerasa que provoca un aumento de la expresión de la proteína TERT, con el consiguiente mantenimiento de la longitud de los telómeros, que en condiciones normales se acortan con cada ciclo de división celular^{111,113}. De hecho, en el astrocitoma histológicamente de grado inferior, difuso e *IDHwt*, la presencia de mutaciones en el promotor de *TERT* y/o de la amplificación del gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*) y/o de la ganancia combinada del cromosoma 7 completo, más la pérdida de todo el cromosoma 10 significa un comportamiento tumoral similar al glioblastoma (grado IV de la OMS)^{110,111}.

A diferencia de los oligodendrogliomas con mutaciones *IDH* y con codeleción 1p/19q, los astrocitomas con *IDH* mutado presentan mutaciones en el gen *ATRX* y en el gen de la proteína tumoral p53 (*TP53*) y son mutuamente excluyentes con la codeleción de 1p/19q^{114,115}. Por lo tanto, esta alteración derivada se observa de manera prácticamente específica en los tumores de estirpe astrocitaria.

Las mutaciones en *ATRX* están implicadas en lo que se conoce como alargamiento alternativo de los telómeros (ALT), uno de los mecanismos que utilizan las células cancerosas para asegurar su inmortalidad¹¹⁶. Los anticuerpos que se utilizan en la práctica clínica diaria marca la isoforma nativa de la proteína (con una tinción nuclear), por lo que la pérdida de la tinción inmunohistoquímica nuclear es un fuerte indicador de la presencia de una mutación en *ATRX*¹¹⁷, mientras que la tinción nuclear fuerte y extensa de los núcleos de las células tumorales para la proteína tumoral p53 indica la presencia de una mutación en *TP53*.

1.9. Alteraciones del número de copias somáticas (SCNA) en GB

Las alteraciones del número de copias (SCNA) son cambios somáticos en la estructura del cromosoma que resultan en una ganancia o pérdida de copias en secciones de ADN. En otras palabras, las SCNA implican ganancias (amplificaciones, duplicaciones) o pérdidas (deleciones)

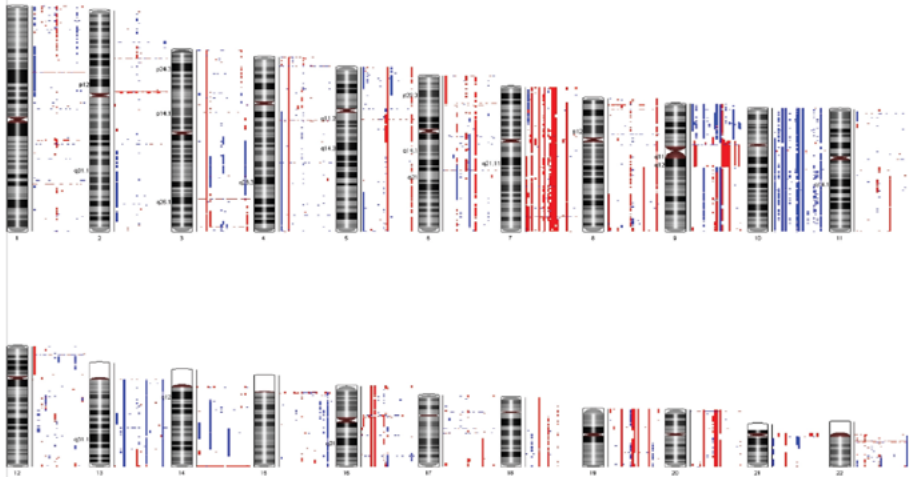


Figura 9. Paisaje genómico del glioblastoma. Cariotipo digital que muestra las SCNA más comunes en el glioblastoma. Se muestran los principales eventos de ganancia (rojo) y pérdida (azul)¹¹⁸.

genómicas que alteran el estado diploide de un locus en particular, alterando así el genoma equilibrado. Las SCNA impactan el fenotipo del cáncer mediante la amplificación de oncogenes y deleciones de genes supresores de tumores.

Las SCNA observadas con más frecuencia en GB incluyen pérdida, o pérdida parcial, de los cromosomas 9 y 10; polisomía de los cromosomas 7, 19 y 20; deleción focal del locus *CDKN2A/B* (9p21.3). Los eventos de amplificación más comunes ocurren en el cromosoma 7 (*EGFR/CDK6/MET*), en el cromosoma 12 (*MDM2* y *CDK4*) y en el cromosoma 4 (*PDGFRA*) (Figura 9).

Las SCNA que se dirigen a los cromosomas 7 y 10 son algunos de los eventos más tempranos en la evolución del tumor GB.

1.10. Marcadores epigenéticos

Varios marcadores epigenéticos también muestran valor pronóstico y/o predictivo en el glioma¹¹⁹. Los pacientes que albergan gliomas que presentan metilado el ADN del promotor *MGMT* muestran una mayor supervivencia general y un aumento del tiempo hasta la progresión de la enfermedad después del tratamiento con agentes alquilantes o de radiación^{120,121}. El estado de metilación del ADN del promotor *MGMT* se usa para guiar la terapia de los gliomas anaplásicos con *IDH1/2* de tipo salvaje y en el glioblastoma de los pacientes de edad avanzada^{120,121}.

Otro hito importante que destaca la importancia clínica de los marcadores epigenéticos en los gliomas es el descubrimiento de un fenotipo metilador de islas CpG en gliomas (G-CIMP)¹²². Con base en los estudios de la TCGA, se puede identificar la presencia de otro grupo de tumores en GB (aproximadamente el 9%), que muestran metilación de sus islas CpG en más de 1500 loci a lo largo del genoma¹²². Este fenotipo G-CIMP, se caracteriza por presentar diferentes alteraciones en el número de copias, patrones de metilación del ADN y perfiles

Gen	Proneural / Neural	Clásico	Mesenquimal	G-CIMP
Edad	Joven	Edad avanzada	Edad avanzada	Joven
Pronóstico	Bueno	Malo	Malo	Bueno
Proceso activo	Neurogénesis	Proliferación	Angiogénesis	Neurogénesis
Marcador celular	Neuroblasto	Célula madre	Célula madre	Neuroblasto y no neuroblasto
Aberración cromosómica	Chr.7 y Chr.10 Normales	Ganancia de Chr.7 Pérdida de Chr.10	Ganancia de Chr.7 Pérdida de Chr.10	Ganancia de los Chrs. 8 y 10 Mutaciones IDH1
Loci <i>EGFR</i> / PTEN	<i>EGFR</i> normal PTEN intacto	<i>EGFR</i> amplificado Pérdida de PTEN	<i>EGFR</i> amplificado Pérdida de PTEN	<i>EGFR</i> normal PTEN intacto
Vía alterada	NOTCH, TP53, PDGFRA, PIK3C, IDH	AKT, CDKN2A	Met, NF1	MYC

Tabla 3. Resumen de subtipos de GB basado en análisis de estado de metilación y transcriptómica. Agrupamiento de GB en varios subtipos moleculares: proneural, neural, proliferativo (o clásico), mesenquimal y G-CIMP¹¹⁸.

transcriptómicos distintos en comparación con los otros cuatro subconjuntos de GB (Tabla 3). El proceso de la enfermedad de GB se caracteriza por un conjunto único de cambios moleculares en las células y su microambiente. Los pacientes con tumores G-CIMP (G-CIMP positivos) presentan un mejor pronóstico que sin este fenotipo (G-CIMP negativo).

1.10.1. Metilación del promotor de MGMT

La metilación del ADN ocurre al agregar un grupo metilo al quinto átomo de carbono del anillo de citosina, lo que da como resultado la 5mC (5-metilcitosina). Esta modificación covalente la realiza un grupo de enzimas conocidas como DNMTs (*DNA methyltransferases*) (Figura 10).

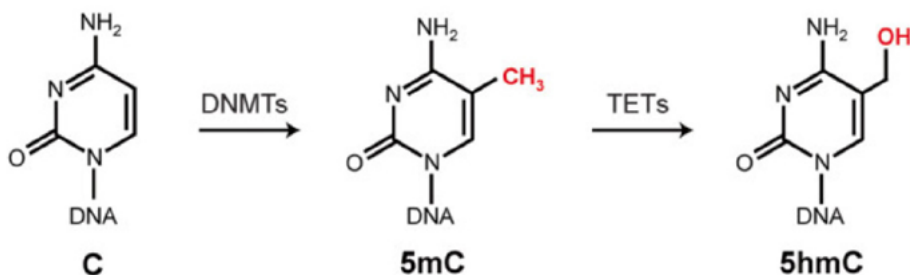


Figura 10. Metilación de la citosina mediada por las DNA metiltransferasas (DNMTs), seguida de la hidroxilación de la 5mC mediada por miembros de la familia de proteínas a la que pertenece TET2¹²³.

Estas proteínas reconocen secuencias de dinucleótidos (citosina-guanina unidas por un fosfato) que normalmente se encuentran en regiones genómicas llamadas islas CpGs que, a su vez, están ubicadas en o cerca de la regiones promotoras de genes.

El estado de metilación del promotor *MGMT*, ubicado en el cromosoma 10q26, ha sido uno de los marcadores moleculares más estudiados en neurooncología durante la última década, debido a la asociación entre la hipermetilación del promotor *MGMT* y la respuesta a los agentes alquilantes (Figura 11). La hipermetilación del promotor da como resultado el silenciamiento o inactivación del gen, lo que provoca una disminución de los niveles de esta enzima y una mayor susceptibilidad a la quimioterapia con el agente alquilante temozolomida (TMZ). Como explica Hegi y colaboradores, se sabe que la metilación de *MGMT* en GB induce una mejor respuesta a la temozolomida y la supervivencia media casi duplica en comparación con aquellos sin metilación⁴⁰.

La frecuencia publicada de este tipo de hipermetilación en los gliomas varía ampliamente, oscilando entre el 35% y el 73% en los GB, siendo de alrededor del 40% en los GB primarios y de hasta el 70% en los secundarios^{125,126}.

La metilación del promotor *MGMT* está asociada con mutaciones en *IDH1* y, por lo tanto, es más común en los GB secundarios y en los gliomas de grado II y III. En los gliomas con *IDH* mutado, la metilación

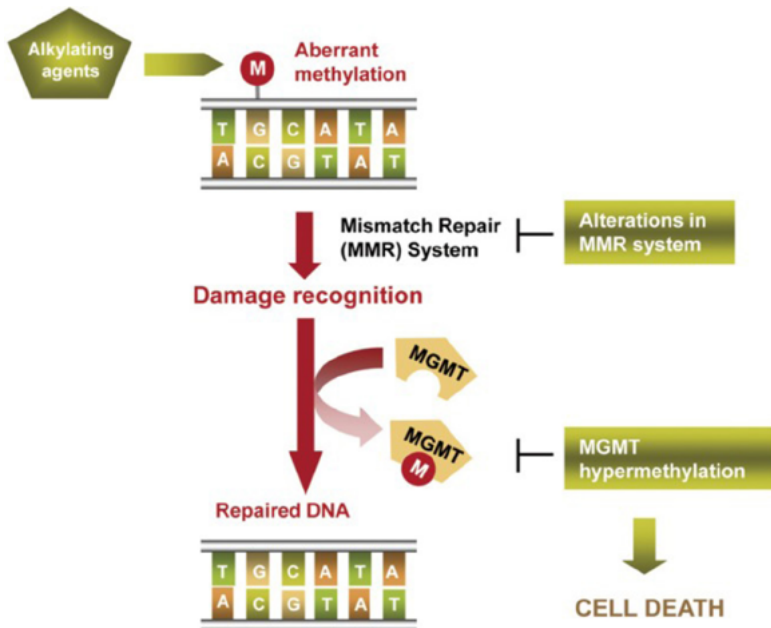


Figura 11. Mecanismo de acción de la proteína MGMT. Los agentes alquilantes provocan daño en el ADN, que es detectado por el sistema de reparación *mismatch repair*. La proteína reparadora MGMT localiza y repara dicho daño¹²⁴.

del promotor MGMT está relacionada con el hecho de que estos tumores son de fenotipo hipermetilador en islas CpG (G-CIMP) y muestran metilación en un amplísimo número de genes.

Actualmente, existe un consenso en que el estado de *MGMT* debe evaluarse en todos los pacientes con un diagnóstico histológico de GB de acuerdo con la clasificación de la Organización Mundial de la Salud de 2016, ya que en este contexto el estado de *MGMT* tiene un fuerte valor pronóstico y potencial información predictiva sobre el beneficio de la quimioterapia con agentes alquilantes.

En la actualidad no existe un acuerdo internacional sobre el método que debe usarse para determinar la metilación del promotor *MGMT* o el valor de corte (el porcentaje promedio de metilación en diferentes sitios CpG) para discriminar con precisión a los pacientes que pueden beneficiarse del

tratamiento con TMZ. Varias publicaciones han abordado este tema^{127,128}. El amplio rango de estos resultados se debe, en parte, a los importantes desafíos técnicos que implica esta determinación. Hay muchas formas de analizar la metilación de *MGMT* y algunas de ellas requieren mucha tecnología y experiencia, lo que ha llevado repetidamente a resultados divergentes en diferentes laboratorios para el mismo tumor¹²⁹.

La técnica más común es la PCR específica de metilación (MS-PCR), que se basa en la conversión de bisulfito de las citosinas no metiladas en uracilos. Esta técnica se puede implementar en parafina y permite una cuantificación de alto rendimiento¹³⁰. También han surgido otras técnicas, incluida la metilación específica de pirosecuenciación¹³¹ y la técnica MLPA específica de metilación (MS-MLPA)¹³².

1.10.2. El fenotipo metilador en islas CpG (G-CIMP)

La metilación del promotor de genes supresores de tumores es un fenómeno común en todos los tipos de cáncer^{133,134}. El ADN se puede metilar en la posición 5´ de las citosinas, generalmente en los dinucleótidos citosina-guanina. Las islas CpG se caracterizan por la presencia de un gran número de sitios CG. Estas islas CpG se encuentran en más de la mitad de regiones promotoras de los genes humanos¹³⁵⁻¹³⁷. Cuando los tumores muestran un aumento general en la metilación del ADN en estas islas CpG, se dice que presentan fenotipo metilador de isla CpG o CIMP¹²². La hipermetilación es un evento epigenético común en muchos cánceres humanos¹³⁸. En el cáncer colorrectal los marcadores para determinar el fenotipo de metilación están bastante establecidos¹³⁹, mientras que en los gliomas nada es claro, ni definitivo. Sin embargo, es cierto, que existen varios estudios que han sugerido diferentes perfiles de marcadores que muestran una potencial utilidad como marcadores diagnósticos, pronósticos y como predictores de respuesta terapéutica.

Se han utilizado varios métodos para estudiar las diferencias en los niveles de metilación de las islas CpG alrededor del sitio de inicio de la transcripción en los genes¹³⁶. Entre ellos, se encuentra el método

basado en el tratamiento de ADN con bisulfito sódico para convertir las citosinas no metiladas en uracilos, mientras que las citosinas metiladas permanecen sin cambios. A continuación, el ADN modificado se analiza mediante diversas técnicas como la MS-PCR, la secuenciación o la pirosecuenciación o la plataforma MassARRAY EpiTYPER (Sequenom). Esta última, es un sistema que combina la unión enzimática específica de base con la espectrometría de masas MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption/ionization Time Of Flight*)¹⁴⁰.

El fenotipo metilador (CIMP) en los gliomas se determinó en base al análisis de datos a gran escala, en el que se determinó el estado de metilación de miles de regiones CpG para dividir estos tumores en dos grupos: aquellos que presentan un estado de hipermetilación global (CIMP positivos) y aquellos sin metilación (CIMP negativos)^{122,141}. Los gliomas positivos para CIMP muestran una supervivencia más prolongada¹⁴². Además, el fenotipo CIMP no solo se asoció con la supervivencia, sino también con la metilación de *MGMT*, la codeleción de 1p/19q y la mutación en el gen *IDH1*. En los gliomas, este fenotipo parece estar asociado con mutaciones en el gen *TP53*.

Según estos datos, es probable que las mutaciones en *IDH1/2* sean la base molecular para la formación del fenotipo G-CIMP en los gliomas, lo que destaca la interacción entre los cambios genéticos y epigenéticos en los tumores, incluido el GB.

En el GB, el subtipo proneural se asocia principalmente con mutaciones *IDH1/2* y se subclasifica, además, como CIMP positivo o CIMP negativo (de las cuales G-CIMP-positivo muestra un mejor pronóstico). Sin embargo, el subtipo proneural por sí solo parece tener poca importancia pronóstica a menos que se considere en relación con el estado de mutación *IDH1/2*¹⁴³. De hecho, Turcan et al. demostraron que la mutación de *IDH1* por sí sola puede modular el perfil de metilación genómica del tumor, promoviendo así el desarrollo de fenotipo CIMP-positivo en gliomas^{140,144}. Aunque también se ha descrito que no todos los tumores que albergan mutaciones de *IDH1*

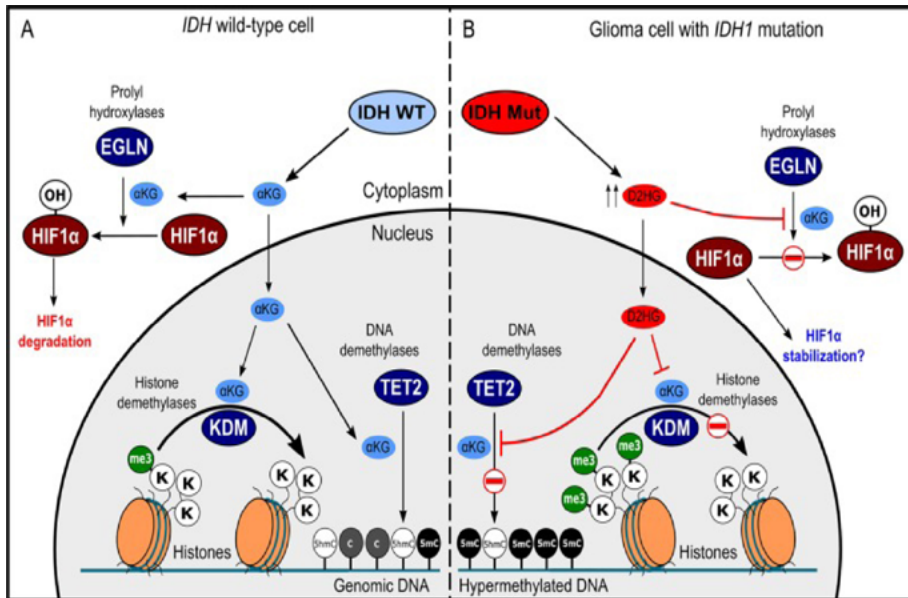


Figura 12. Efectos celulares de niveles elevados de 2HG en células de glioma. La 2HG puede acumularse en las células de glioma a niveles 100 veces superior en comparación con el tejido normal. La acumulación excesiva de 2HG altera la función normal de las enzimas dependientes de αKG. αKG funciona como cofactor para varias dioxigenasas celulares, incluidas las histonas lisina desmetilasas, TET citosina hidroxilasas y HIF prolyl hidroxilasas. Reproducido de la referencia⁵⁵.

eran positivas para CIMP, lo que sugiere que las mutaciones en *IDH1* no son el único determinante de este fenotipo¹⁴². Como se discutió anteriormente, *IDH1* mutado cataliza la reducción de αKG a 2HG. Este oncometabolito puede afectar la expresión génica a través de varios mecanismos¹⁴⁵ (Figura 12):

- Por inhibición competitiva de dioxigenasas dependientes de αKG como las KDMs (*Histone lysine demethylases*) y, por tanto, alterando los niveles de metilación de las histonas.
- Al inhibir las hidroxilasas 5mC de la familia TET (*Ten-eleven translocation*) por competitividad directa con el αKG, produce la acumulación de 5mC que alterará los niveles de expresión de un gran número de genes.
- Por un mecanismo que altera la expresión de los HIF (*Hypoxia-inducible factor*).

1.11. Perfiles metabolómicos en el glioblastoma

En los últimos años, los enfoques basados en el metabolismo han sido reconocidos como una herramienta emergente para descubrir productos de reacciones bioquímicas celulares que conducen a la proliferación celular en una variedad de tumores malignos¹⁴⁶⁻¹⁵⁰. Además, el perfil metabólico ha permitido la detección e identificación de varias vías celulares importantes^{151,152}. Las aplicaciones de la metabolómica en la oncología clínica han mostrado un gran potencial para la detección temprana, el diagnóstico y el pronóstico del cáncer, además de ser un biomarcador predictivo/farmacodinámico de la eficacia de los fármacos^{153,154}.

Actualmente, la patología metabólica del glioblastoma se desconoce en gran medida, ya que la heterogeneidad del tumor y las alteraciones genéticas alteran el metabolismo y el perfil metabólico dentro del mismo tumor, lo que dificulta la correlación de las firmas metabólicas. La influencia de los eventos genéticos y epigenéticos en el metabolismo energético de una célula conducen a menudo a su comportamiento. Por lo tanto, las nuevas terapias contra el cáncer avanzan cada vez más hacia la reprogramación de este metabolismo. Este tipo de reprogramación puede afectar las vías metabólicas esenciales para el crecimiento y la supervivencia del tumor, como la vía Kennedy (CDP-colina), la glucólisis anaeróbica, la oxidación de ácidos grasos y la producción de antioxidantes. En algunos tipos de cáncer se ha encontrado que los tumores que son metabólicamente más activos tienen niveles más altos de metabolitos involucrados en estas vías¹⁵⁵⁻¹⁵⁸.

La elaboración de perfiles de metabolitos de alto rendimiento (metabolómica) permite determinar metabolitos en tejidos, cuyos niveles se ven alterados ante la presencia de una patología neoplásica. Estos cambios metabólicos son particularmente importantes en la búsqueda de biomarcadores que puedan usarse para diagnosticar y pronosticar *in vivo* con métodos analíticos para su identificación como

son la técnica de espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) de alta resolución con sonda especial HR-MAS (*High Resolution Magic Angle Spinning*).

Las asociaciones entre características de GB bien establecidas, como son la amplificación del gen EGFR, y el aumento del metabolismo tumoral pueden ayudarnos a comprender mejor las características fenotípicas de las células cancerosas e identificar las vías relevantes asociadas con el desarrollo del cáncer.

1.12. Valor diagnóstico, pronóstico y terapéutico de las alteraciones moleculares

En términos de información molecular, los biomarcadores en neuropatología se pueden categorizar en diagnósticos, pronósticos y predictivos¹⁵⁹. Un mismo biomarcador puede corresponder a más de una categoría. En la Tabla 4, se destacan las principales alteraciones genéticas y su valor como biomarcadores pronósticos y/o predictivos con respecto a la futura utilidad clínica como para nuestro conocimiento actual del glioma.

Alteraciones genéticas	Valor diagnóstico (D), pronóstico (P) y terapéutico/predictivo (T)
<p>Mutación <i>IDH1/2</i> (<i>IDHm</i>)</p>	<p>D Frecuente en astrocitomas de grado II y III de la OMS (> 80%), oligodendrogliomas y glioblastomas "secundarios".</p> <p>P El estatus de <i>IDH</i> mutante en el tumor astrocítico le confiere un mejor pronóstico comparándolo con el <i>IDH</i> de tipo salvaje con el mismo grado histológico de la OMS.</p> <p>T Se cree que las mutaciones de <i>IDH</i> y el G-CIMP hacen que los tumores sean más sensibles a la quimioterapia, como se encontró en los análisis retrospectivos de los ensayos de oligodendrogliomas anaplásicos^{160,161}. La mutación <i>IDH</i>-R132H puede representar un objetivo prometedor para la vacunación específica de la mutación.</p>

Alteraciones genéticas	Valor diagnóstico (D), pronóstico (P) y terapéutico/predictivo (T)
Tumores de tipo salvaje <i>IDH</i> (<i>IDHwt</i>)	P Los GB- <i>IDHwt</i> suelen tener un curso agresivo y se espera que la mediana de supervivencia sea 15 meses con el tratamiento estándar, incluida la radio-quimioterapia.
G-CIMP	Se ha descubierto que las mutaciones de <i>IDH</i> causan cambios epigenéticos que conducen a un fenotipo metilador de islas CpG, denominado G-CIMP ⁵⁶ . Los tumores con 1p/19q codelecionados tendrán un fenotipo de metilación denominado G-CIMP-A (CIMP codelecionado) y los tumores no codelecionados G-CIMP-B (CIMP no codelecionado) ⁵⁵ . Los tumores no codelecionados G-CIMP pueden subdividirse en G-CIMP-alto o G-CIMP-bajo, siendo estos últimos los que presentan una peor supervivencia global ⁵⁶ . Se ha demostrado que los patrones de metilación de los tumores primarios del sistema nervioso central (SNC) son relativamente estables a lo largo del tiempo o de la progresión de la enfermedad y que pueden facilitar la clasificación de los tumores del SNC ^{162,163} .
Codeleción 1p/19q [Brazo corto del cromosoma (1p)] [Brazo largo del cromosoma 19 (19q)]	D Requerido para el diagnóstico del oligodendroglioma (ya que lo que cuenta es la codeleción completa de estos brazos, idealmente la prueba molecular permite discriminar la pérdida completa de la parcial de 1p y 19q). P Los pacientes con este perfil molecular son identificados como un subgrupo de gliomas con un pronóstico especialmente bueno ¹⁶⁴ . T Los tumores portadores de estas deleciones responden favorablemente tanto a la RT como a la quimioterapia, incluyendo agentes alquilantes, normalmente el tratamiento con PCV (Procarbazona, Lomustina y Vincristina) pero también TMZ ¹⁶⁵⁻¹⁶⁷ . También albergan mutaciones <i>IDH</i> .
Mutación en <i>ATRX</i> (Alpha-thalassemia/mental retardation syndrome X)	D Presente con frecuencia en tumores astrocíticos con mutaciones en <i>IDH</i> . Sin embargo, no son necesarias para el diagnóstico.
Mutación en <i>TP53</i> (Tumor protein p53)	D Frecuente en tumores astrocíticos con <i>IDHm</i> (> 80%), pero también bastante frecuente en gliomas difusos con <i>IDH</i> de tipo salvaje; muy poco frecuente en oligodendrogliomas. Sin embargo, no son necesarias para el diagnóstico.

Alteraciones genéticas	Valor diagnóstico (D), pronóstico (P) y terapéutico/predictivo (T)
Mutación promotor <i>TERT</i> (Transcriptasa inversa de la telomerasa)	<p>Un marcador molecular adicional que ha sido de interés en la última década es la mutación <i>TERT</i>, que afecta a la zona del promotor en C228T (-124 pb desde el sitio de inicio de la transcripción (TSS) y C250T (-146 pb aguas arriba del sitio de inicio ATG).</p> <p>D/P Presente en casi todos los tumores con mutaciones en <i>IDH</i> y los oligodendrogliomas (codeleción 1p/19q). Las mutaciones del promotor de <i>TERT</i> en C228T y C250T son un factor de buen pronóstico¹⁶⁸.</p> <p>D Frecuente en GB-IDHwt (en más del 70% de los GB¹⁶⁹).</p> <p>D/P La presencia de mutación en el promotor <i>TERT</i> en el astrocitoma IDHwt de grado histológico más bajo indica un comportamiento agresivo (glioblastoma molecular). Curiosamente, en este grupo constituyen un factor pronóstico negativo¹⁷⁰.</p>
Delección homocigosis <i>CDKN2A/B</i> (Inhibidor de la quinasa dependiente de la ciclina 2A/2B)	<p>D Ocurre en tumores astrocíticos <i>IDHwt</i> con características piloides.</p> <p>P Las delecciones homocigóticas de <i>CDKN2A/B</i>, que conducen a la desregulación del ciclo celular, han sido identificadas como un factor pronóstico negativo en tumores astrocíticos difusos con <i>IDHm</i> y mutación <i>TP53</i>^{171,172}.</p>
Metilación de la región promotora de O6-metilguanina ADN metiltransferasa (<i>MGMT</i>)	<p>Como se mencionó anteriormente, para el tratamiento con el agente alquilante TMZ, el estado de metilación del promotor del gen <i>MGMT</i> es determinante^{13,40,173,175}. También otros agentes alquilantes dependen de esta metilación que provoca el silenciamiento de la transcripción del gen <i>MGMT</i>¹⁶¹.</p> <p>P Notificado como factor pronóstico favorable independiente en glioblastomas (independientemente del tratamiento).</p> <p>T El estado de metilación del promotor de <i>MGMT</i> es el factor predictivo más importante para el tratamiento con agentes alquilantes^{13,40,174}. Para la respuesta a la RT no es importante el estado de <i>MGMT</i>, que por lo tanto es el tratamiento de elección hasta la fecha para aquellos tumores con <i>MGMT</i> no metilado¹³.</p>
Amplificación <i>EGFR/EGFRvIII</i> (Epidermal growth factor receptor)	<p>D Amplificación de número elevado de copias común en GB-IDHwt (~40%).</p> <p>D <i>EGFRvIII</i> presente en aproximadamente la mitad de los glioblastomas con amplificación de <i>EGFR</i>.</p> <p>T Posible diana terapéutica. En ese contexto, los inhibidores de las tirosinas quinasa no han demostrado, hasta la fecha, una utilidad terapéutica en los pacientes con GB que presentan alteraciones de <i>EGFR</i>¹⁷⁶. Existen, sin embargo, vacunas contra <i>EGFRvIII</i> que han conseguido resultados prometedores en estudios preliminares.</p>

Tabla 4. Principales alteraciones genéticas y su valor como biomarcadores diagnósticos y/o pronósticos.

1.13. Clasificación basada en genoma, epigenoma y transcriptoma

Diversos estudios multiómicos del panorama de GB en *Cancer Genome Atlas Research Network* (TCGA), *Chinese Glioma Genome Atlas* (CGGA) y otros programas que proporcionan ideas y recursos para contribuir al desarrollo de nuevos tratamientos contra el cáncer, revelan juntos el complicado perfil genético de GB^{27,30,31}. Estas alteraciones moleculares, incluidas las codeleciones 1p/19q, mutaciones del gen *IDH1/2*, mutaciones del gen *PTEN*, mutaciones de *TP53*, mutaciones del promotor del gen *TERT*, *ATRX* y la amplificación del gen *EGFR* están obligando a los médicos a reconsiderar el tratamiento tradicional del GB^{30,32}. La clasificación del GB basada en alteraciones genéticas acorta el tiempo desde el diagnóstico hasta el tratamiento y mejora en gran medida la precisión y los objetivos del tratamiento.

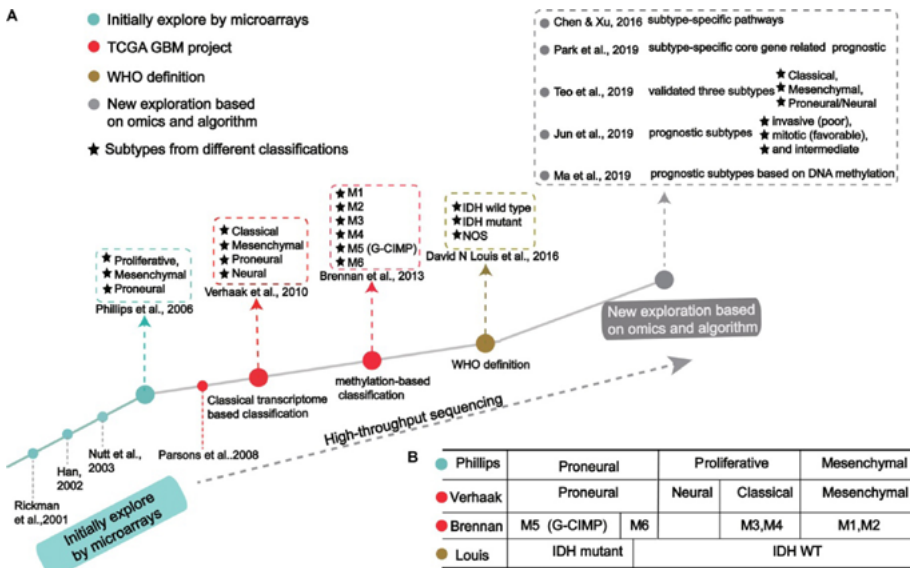


Figura 13. Resumen de las principales clasificaciones moleculares de GB que orientan el diagnóstico, pronóstico y recomendaciones terapéuticas¹⁷⁷. (A) Cronología de la clasificación de GB y subtipos clásicos. (B) Comparación relativa entre los subtipos obtenidos a partir de los diferentes métodos de clasificación.

En 2020, Zhang y col. publicaron una revisión exhaustiva que detalla cómo ha cambiado el proceso de clasificación del GB con el tiempo como resultado de los algoritmos de clasificación y el desarrollo de nuevas tecnologías para llegar a la clasificación existente¹⁷⁷. El GB se divide en varios subtipos basados en los perfiles de transcripción, alteraciones genéticas y metilación del ADN (Figura 13). En el artículo también se describen las características moleculares de cada categoría y la relación entre los diferentes métodos de clasificación.

Es cada vez más evidente que estos procesos no solo difieren de un paciente a otro, sino que también se diferencian entre subtipos dentro del mismo tumor. Estas diferencias arrojan luz sobre las dificultades que se observan al intentar desarrollar nuevas terapias farmacológicas dirigidas frente a esta enfermedad.

2. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO Y OBJETIVOS

El glioblastoma es el tumor primario más común y agresivo del Sistema Nervioso Central con una esperanza de vida muy corta. Una de las razones de la falta de éxito en el tratamiento del glioblastoma es su compleja heterogeneidad intertumoral e intratumoral. Las diferentes poblaciones celulares que forman el tumor presentan distintas anomalías genéticas. El fracaso de muchos tratamientos es debido a la falta de eficacia en las diferentes poblaciones celulares presentes en el tumor, hecho que produce la incapacidad de predecir con precisión la sensibilidad o resistencia a los tratamientos.

El estudio tradicional del glioblastoma ha investigado el papel de múltiples genes en el avance de su progresión. Dentro de los biomarcadores genéticos el *EGFR* (receptor del factor de crecimiento epidérmico) se encuentra entre las alteraciones genéticas que con mayor frecuencia presenta el glioblastoma. La activación del *EGFR*, por amplificación y mutación, inicia una cascada de señalización integrando numerosas vías de señalización que conducen a respuestas celulares específicas que contribuyen a la formación del tumor y la progresión. Sin embargo, hasta la fecha, las terapias dirigidas contra este tipo de receptores aún no han mostrado un claro beneficio clínico. Una mejor comprensión de la red de señalización de *EGFR* y sus interrelaciones con otras vías es esencial para desarrollar mejores agentes terapéuticos.

El **principal objetivo** de esta tesis doctoral es caracterizar nuevos biomarcadores y alteraciones genéticas y estudiar cómo se relacionan con los diferentes estatus de presentación del *EGFR* para abordar mejor el conocimiento de este tumor, así como confirmar su valor pronóstico o predictivo de respuesta al tratamiento.

Los **objetivos específicos** planteados para este trabajo son:

- 1. Caracterizar marcadores o alteraciones genéticas y epigenéticas que permitan abordar mejor el conocimiento de los glioblastomas.**

- 1.1 Determinar, en 150 muestras de estudio, el modelo de amplificación de *EGFR* y mutación *EGFRV8* a partir de muestras incluidas en parafina.
- 1.2. Estandarizar la técnica de determinación de los patrones de *EGFR* mediante MLPA en muestras incluidas en parafina y compararla con las técnicas iFISH y la amplificación por q-PCR utilizadas hasta ahora.
- 1.3. Clasificar los GB según el estatus del *EGFR* y evaluar si esta clasificación puede tener una utilidad clínica en términos de diferencias en la supervivencia.
- 1.4. Analizar 45 marcadores moleculares mediante MLPA y secuenciación Sanger para conocer la frecuencia de estas alteraciones moleculares en nuestra serie y obtener un modelo que nos permita clasificar e identificar subgrupos en nuestra población de GB.
- 1.5. Identificar genes y rutas de señalización implicados en los diferentes subgrupos.
- 1.6. Evaluar los niveles de metilación de las islas CpG presentes en las regiones promotoras de 10 genes de interés para establecer una correlación con el estado de amplificación del *EGFR*.

2. Confirmar el valor pronóstico de estos marcadores en nuestro grupo de pacientes y avanzar en la determinación de nuevos marcadores pronósticos o predictivos de respuesta al tratamiento de los GB.

- 2.1. Describir los aspectos clínico-histopatológicos y evolutivos de los pacientes.
- 2.2. Analizar si existe relación entre los diferentes marcadores moleculares estudiados y la supervivencia.
- 2.3. Relacionar los cambios genéticos y epigenéticos con la supervivencia.

3. RESULTADOS

Comprender la patogenia molecular del GB es fundamental para mejorar su diagnóstico y tratamiento. En esta tesis se presenta el análisis integrado de datos histológicos, genómicos, de modificación postraducciona l y metabólicos en 137 GB, sin tratamiento previo. Estos datos nos proporcionarán información sobre la biología del GB contribuyendo en la mejor estratificación de los pacientes con el objeto de administrarles un tratamiento más eficaz.

3.1. Datos clínicos e histopatológicos

El estudio incluyó 137 pacientes con GB, de los cuales 135 casos se diagnosticaron como GB clínicamente primarios por no tener ningún diagnóstico previo de astrocitoma. La edad media en el momento del diagnóstico fue de 57,7 años (rango de edad de entre 24 y 81 años) y con una relación hombre/mujer de 1,17. En cuanto a la localización más frecuente del tumor, el 20,3% de los casos se asentaban en el lóbulo frontal, el 35% en el lóbulo parietal y el 36,6% en el temporal. En 44 de los casos (32,1%) la lesión era multifocal (definida como dos lesiones en diferente localización). El estado funcional preoperatorio se evaluó según la Escala del Estado Funcional de Karnofsky (KPS) y oscilaba entre el 40 y el 100%.

Tras el diagnóstico inicial de GB el tratamiento estándar consistió en lograr la máxima resección quirúrgica del tumor en todos los pacientes. Ninguno de los pacientes había recibido quimioterapia o radioterapia antes de la cirugía. El tratamiento, de primera línea, incluyó radioterapia (50-65 Gray) con quimioterapia concomitante y adyuvante a base de temozolomida después de la cirugía. La supervivencia global (SG) fue de 210 días y no reflejó diferencias estadísticas según el sexo ni la edad.

Los datos clínicos, que incluyen edad, sexo, la ubicación del tumor, el tamaño, los síntomas iniciales y la escala KPS se resumen en la Tabla 5. Se excluyeron los dos casos de GB secundarios.

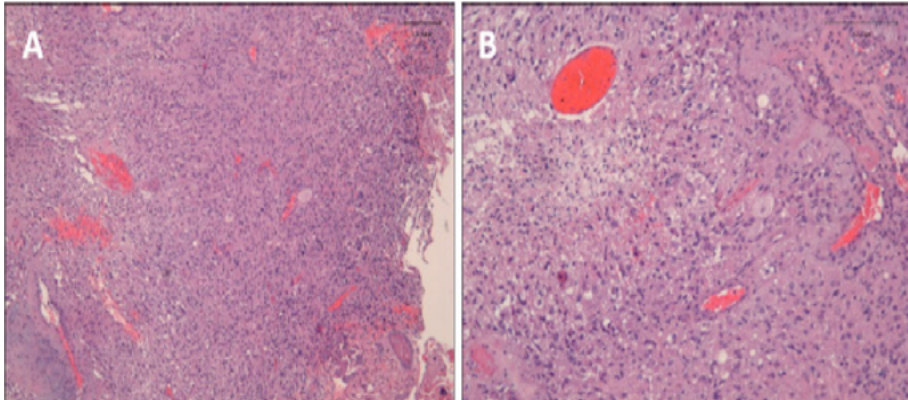


Figura 14. Características histológicas del GB IDH-wt. **(A)** Densidad celular alta. Patrón indiferenciado con hiperplasia vascular y necrosis (Hematoxilina-Eosina, 10x). **(B)** Presencia de células anaplásicas, heterogéneas y proliferación microvascular (Hematoxilina-Eosina, 20x).

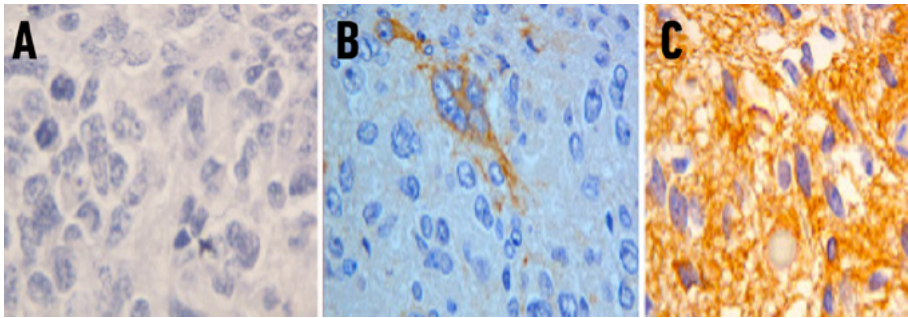


Figura 15. Resultados de IHQ para el marcaje con anti-*EGFR* en secciones incluidas en parafina. **(A)** Tejido sin inmunoreacción. **(B)** Tinción focal de *EGFR*, que muestra la expresión de varias células tumorales mientras que otras son negativas. **(C)** Fuerte tinción. Ampliación 40x.

Histológicamente, todos los tumores mostraron características de GB con células tumorales astrocíticas pleomórficas, proliferación microvascular prominente con angiodisplasia, patrones pseudoglomerulares y necrosis (Figura 14).

Los estudios inmunohistoquímicos (IHQ) se evaluaron sobre *tissue microarrays* (TMAs). Los anticuerpos utilizados en el estudio fueron: GFAP, Ki-67/MIB-1 y *EGFR* (Dako, Glostrup, Dinamarca). La expresión

de GFAP se confirmó en células neoplásicas. El número de mitosis osciló entre 0 y 20, con un valor medio de 6. El porcentaje medio de células positivas para Ki-67 fue del 31,6%; con un rango de entre el 5 y el 80%.

Para el estudio de *EGFR* se realizó la valoración de la cantidad de células teñidas: 0 (tinción negativa), 1 (ligera o focal), 2 (moderada), y 3 (abundante). Cuando la valoración fue de 2 o 3, se consideró que existía sobreexpresión, mientras que puntuaciones de 0 o 1 se definieron sin sobreexpresión (Figura 15).

3.2. Alteraciones genéticas. Relación entre las diferentes variables moleculares y la supervivencia

3.2.1. Estudio de las mutaciones de IDH por secuenciación Sanger

De los GB primarios confirmados ($n = 135$) se secuenció *IDH1* e *IDH2*, siendo la mayoría *IDHwt* ($n=128$), y un pequeño subgrupo de siete tumores que mostró mutaciones de *IDH1-R132H* (*GB-IDHm*). Estos pacientes afectados por *GB-IDHm* eran significativamente más jóvenes (40,9 años en *IDHm* frente a 59 años en *IDHwt*, $p < 0,001^{**}$). La supervivencia global también fue significativamente mayor en los pacientes con *IDHm* frente a *IDHwt* (3300 días frente a 180 días, $p < 0,001^{**}$).

Con respecto a los 128 casos sin mutación en *IDH*, el 63,9% de los pacientes tenían mas de 55 años en el momento del diagnóstico, el 56,3% eran hombres y el 76,9% tenían un KPS ≤ 85 antes de la operación. El coeficiente de correlación de Pearson demostró una asociación entre el tamaño del tumor y la supervivencia promedio ($p = 0,020^*$).

En la Tabla 5, se detallan los datos clínicos y el estado mutacional de *IDH* según los parámetros estudiados en GB.

3. RESULTADOS

Parameter	Specification	Outcome	Wild-type IDH1/2 (n= 128)	Mutated IDH1 (n= 9)	P value
Age	Mean (range), in years	57.7 (24-81)	59 (24-81)	40.9 (32-52)	***<0.001mw
	≤55	40.6 %	36.1 %	100 %	***<0.001 χ ²
	>55	59.4 %	63.9 %		
Sex	Male	54.0 %	56.3 %	22.2 %	0.080ft
	Female	46.0 %	43.7 %	77.8 %	
Tumor location	Parietal	35.0 %	33.9 %	50.0 %	0.282kw
	Frontal	20.3 %	19.1 %	37.5 %	
	Temporal	36.6 %	38.3 %	12.5 %	
	Occipital	4.9 %	5.2 %		
	Intraventricular	0.8 %	0.9 %		
	Corpus Callosum	2.4 %	2.6 %		
Size (cm³)	Mean (range)	5.2 cm (2-11)	5.1 cm (2-11)	6.0 cm (5-7)	0.210mw
Initial symptom	Neurological deficit	30.0 %	32.1 %	0 %	0.146kw
	Epileptic seizure	21.7 %	21.4 %	25.0 %	
	Intracranial hypertension	48.3 %	46.5 %	75.0 %	
KPS	≤85	76.9 %	77.0 %	75.0 %	1.000ft
	>85	23.1 %	23.0 %	25.0 %	
Overall survival	Median (95 CI)	210 days	180 days	3,300 days	***<0.001lr

Date are mean (range), number (%), or median (95%CI). Abbreviations: ft, Fisher's exact test; KFS, Karnofsky Performance Status; kw, Kruskal-Wallis test; lr, long-rank test; mw, Mann-Whitney-Wilcoxon test and χ², Pearson's chi-squared test.

Tabla 5. Datos clínicos y estado mutacional de *IDH* de 137 pacientes con GB.

3.2.2. Evaluación del estado de EGFR por iFISH, MLPA y qPCR

Este análisis se realizó a los 128 GB primarios sin mutación en *IDH1*, excluyéndose de este estudio los casos que presentaban la mutación IDH1-R132H.

3.2.2.1. Amplificación del gen EGFR

Todos los GB fueron analizados por iFISH y MLPA. Se observaron casos con amplificación de *EGFR* en el 64,4% o el 70,1% de los casos si lo analizamos por iFISH o por MLPA respectivamente. Los tipos de amplificación encontrados por iFISH fueron: 1) amplificación de alto nivel en 51,7% de los casos (H-amp), 2) amplificación de bajo nivel en 12,7% de los casos (L-amp) y 3) sin amplificación en el 35,6% de los casos (N-amp) (Figura 16). La fracción de células amplificadas con *EGFR* en el grupo 1 osciló entre el 20% y el 90% con un elevado número de copias de genes en cada célula. La fracción de células amplificadas con *EGFR* en el grupo 2 osciló entre el 5% y el 20%, con un número reducido de copias de genes en las células que presentan amplificación (3-16 copias). En el grupo 3 no hubo amplificación de *EGFR*. Anteriormente, se ha demostrado que esta clasificación es útil para estudiar los niveles de amplificación de *EGFR* tanto en células cultivadas como en tejidos tumorales primarios mediante FISH y análisis citogenético⁶⁰.

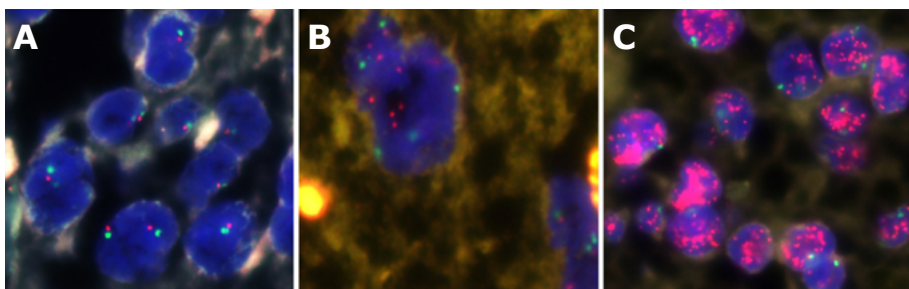


Figura 16. Patrones de amplificación de *EGFR* en GB analizado por Hibridación fluorescente *in situ*. Sondas para el *EGFR* y el centrómero 7 se marcaron con rojo y verde respectivamente. **(A)** Células tumorales no amplificadas. **(B)** Células tumorales con amplificación de bajo nivel/ ganancia de número de copias de *EGFR* y polisomía del cromosoma 7. **(C)** Células tumorales que muestran una amplificación de alto nivel de *EGFR*.

De manera similar, el análisis MLPA, que solo separa en dos categorías, mostró que el 29,7% de los casos no tenían ganancias de *EGFR*, mientras que el 70,1% de los casos mostraron ganancias de copias de *EGFR*. En general, hubo una buena correspondencia entre los resultados de la amplificación de *EGFR* medidos mediante técnicas iFISH y MLPA. Comparando FISH H-amp y L-amp con MLPA "ganancia", y FISH N-amp con MLPA "sin ganancia", la concordancia entre ambas técnicas fue buena, con un resultado coincidente en 83,05% de las muestras (índice kappa de Cohen:0.610). La concordancia fue del 93,4% para los GB L-amp y H-amp evaluados por iFISH que fueron detectados como ganancias por MLPA. En cuanto a los tumores N-amp, la concordancia descendió al 64,3%.

La determinación visual del *EGFR* hizo que iFISH fuera más adecuado para categorizar los casos según su estado de amplificación. Por lo tanto, los siguientes análisis con respecto al estado de amplificación de *EGFR* se basaron de acuerdo con los datos de iFISH. Entre los 128 pacientes con GB, no encontramos asociaciones significativas entre la amplificación de *EGFR* y la supervivencia ($p=0,387$). Los datos clínicos tampoco revelaron diferencias significativas.

3.2.2.2. Expresión del gen *EGFR*

La expresión de ARNm de *EGFR* se cuantificó mediante qRT-PCR en un subgrupo de la población en estudio. Se determinó si la expresión del *EGFR* se correlacionaba con la activación por amplificación del *EGFR*. En comparación con el grupo N-amp, encontramos que los tumores del grupo H-amp mostraron un aumento de más de 3,8 veces en la expresión de ARNm de *EGFR*. Y no se detectó ningún aumento en la expresión de ARNm de *EGFR* en los tumores del grupo L-amp en comparación con los tumores del grupo N-amp (Figura 17). Por tanto, llegamos a la conclusión de que la amplificación del gen *EGFR* se correlaciona con la expresión de *EGFR*.

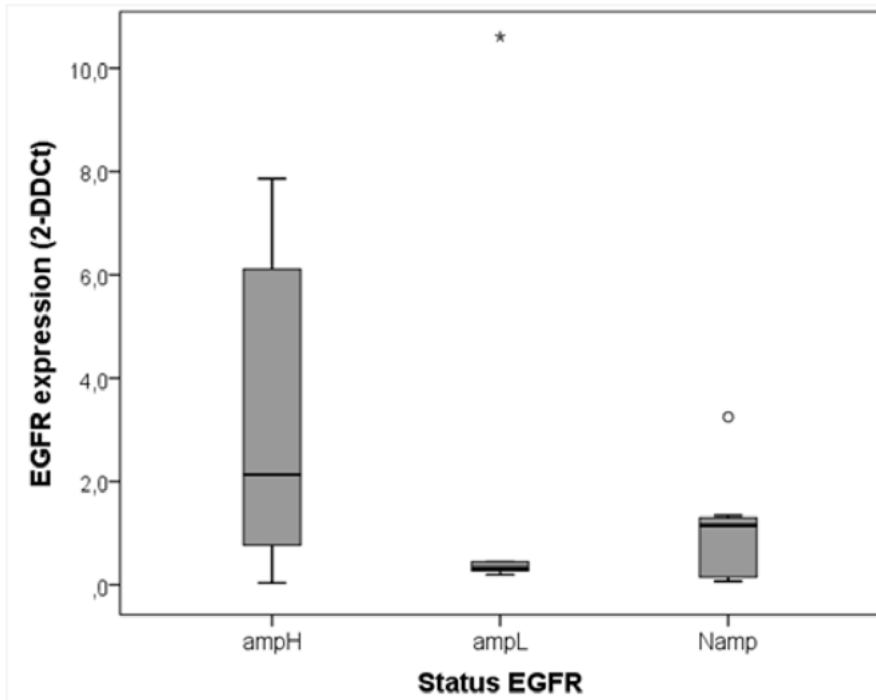


Figura 17. Relación de la expresión ARNm de EGFR en GB con los tipos de amplificación encontrados por iFISH.

3.2.2.3. Estudio de la presencia del mutante *EGFRvIII* por MLPA

Los GB IDHwt (n=128) mostraron *EGFRvIII* en el 34,1% de los casos (n= 45). Los datos clínicos no revelaron diferencias entre ambos grupos en cuanto a edad, localización del tumor ni tamaño. No obstante, hubo un aumento significativo de la presencia de esta variante en mujeres (55,6% *EGFRvIII* vs 37,3% *EGFRwt*, $p=0,047^*$). El análisis de Kaplan-Meier reveló diferencias estadísticas en la supervivencia global (SG) (Figura 18, $p=0,014^*$), que representa 150 días en *EGFRwt* frente a 90 días en *EGFRvIII* (prueba t de Student $p = 0,027^*$). Además, *EGFRvIII* fue significativamente más frecuente en GB con amplificación de *EGFR*. Lo encontramos en 10 casos en el grupo N-amp (23,8%), 2 casos en L-amp (13,3%) y 31 casos en H-amp (50,8%, $p = 0,003^{**}$).

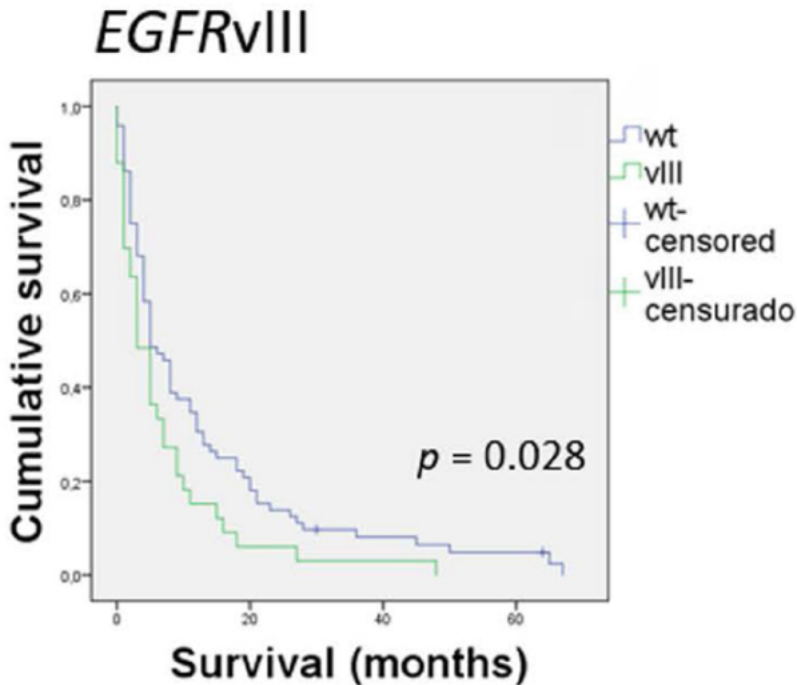


Figura 18. Asociación de la presencia del mutante *EGFRvIII* con la SG. La línea azul representa supervivencia en pacientes con *EGFRwt* (media = 180 días). La línea verde representa la supervivencia de los pacientes que mostraron *EGFRvIII* (media = 150 días). El análisis log rank [Mantel-Cox] demuestra significancia estadística.

3.3. Biomarcadores basados en la caracterización de SCNA por MLPA

Las alteraciones del número de copias somáticas (SCNA) son cambios adquiridos comunes en las células cancerosas (amplificaciones y deleciones) que tienen un papel importante en la progresión del GB. Identificamos que el 100% de los casos de tumores presentaban SCNA en al menos dos de los genes analizados. Además, de todos los loci explorados, encontramos SCNA en todos ellos en al menos siete casos. En la Tabla 6 se muestra un resumen de la prevalencia de alteraciones genéticas identificadas en pacientes con 128 GB-*IDHwt*.

Parameter	Specification	Outcome	Wild-type IDH1/2 (n= 128)	Mutated IDH1 (n= 9)	P value	
TP53	Mutation	20.2 %	17.3 %	50.0 %	*0.028 χ^2	
EGFR FISH	Alteration	61.4 %	64.4 %	22.2 %	*0.012 χ^2	
	N-amp	38.6 %	35.6 %	77.8 %	*0.011 χ^2	
	L-amp	13.4 %	12.7 %	22.2 %		
	H-amp	48.0 %	51.7 %	0.0 %		
EGFRvIII	No	65.9 %				
	Yes	34.1 %				
SCNA	EGFR	Gain	65.4 %	70.1 %	0.0 %	***<0.001 χ^2
		Normal	34.6 %	29.9 %	100 %	***<0.001kw
		Alteration	63.5 %	65.6 %	33.3 %	0.052 χ^2
	CDKN2A	Loss	53.3 %			
		Gain	10.2 %			
	CDKN2B	Alteration	54.0 %	56.3 %	22.2 %	
		Loss	48.9 %			0.080 ft
		Gain	5.1 %			
	PTEN	Alteration	65.9 %	65.9 %	66.7 %	0.961 χ^2
		Loss	55.6 %			
		Gain	10.4 %			
	MTAP	Alteration	52.9 %	53.5 %	44.4 %	0.734ft
	TIMP3	Alteration	65.0 %	64.1 %	77.8 %	0.404 χ^2
	ERBB2	Alteration	26.5 %			
	MVP	Alteration	59.5 %	56.3 %	100 %	*0.020ft
	MEN1	Alteration	60.6 %	57.8 %	100 %	*0.012 χ^2
	ADD3	Alteration	45.3 %	46.9 %	22.2 %	0.183ft
	PCCA	Alteration	44.1 %	46.6 %	12.5 %	0.075ft

Prevalence of genetic alterations and cross tabulation of IDH1 mutation status versus clinical characteristics and genetic alterations are depicted. For genetic alteration, only significant findings are shown (* means $0.05 > p > 0.01$, ** means $0.01 > p > 0.001$, *** means $p < 0.001$). Data are mean (range), number (%), or median (95%CI). Abbreviations: CNA, copy number alteration; ft, Fisher's exact test; KFS, Karnofsky Performance Status; kw, Kruskal-Wallis test; lr, long-rank test; mw, Mann-Whitney-Wilcoxon test and χ^2 , Pearson's chi-squared test.

Tabla 6. Resumen de las características moleculares más relevantes de 137 pacientes con glioblastoma.

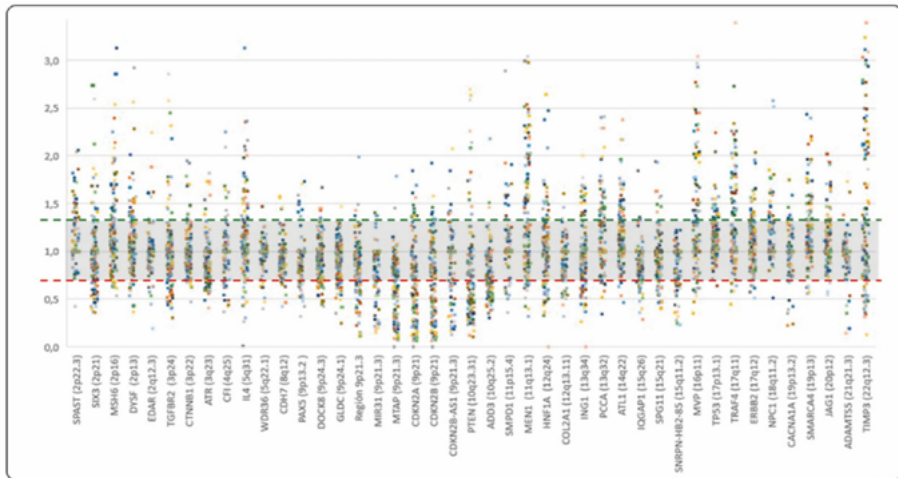


Figura 19. Alteraciones del número de copias somáticas (SCNA) de los GB analizados por MLPA. La distribución de las CNV encontradas en los diferentes genes diana ensayados muestran la heterogeneidad de GB.

En la Figura 19 se puede ver un resumen de todos los SCNA detectados entre los genes estudiados. Esta imagen ofrece un panorama de la alta heterogeneidad genética encontrada en GB. Detectamos alteraciones que afectan a más del 45% de los casos en *EGFR* (70,1% de los casos), *CDKN2A* (65,6%), *TIMP3* (64,1%), *MEN1* (57,8%), *CDKN2B* (56,3%), *MVP* (56,3%), *PTEN* (54,8%), *MTAP* (53,5%), *ADD3* (46,9%) y *PCCA* (46,6%).

De esos loci, estudiamos con más detalle los valores encontrados en *EGFR*, *PTEN*, *MVP* y *ADD3*.

3.3.1. Variación en el número de copias de EGFR

Los GB amplificados con *EGFR* mostraron diferentes CNAs que los casos amplificados sin *EGFR*. En este estudio, cuatro genes revelaron diferencias estadísticas en su afectación dependiendo del estado de amplificación de *EGFR*: pérdidas/ganancias de *MSH6* en 2p16.3, delección de *CDKN2A* y *MTAP*, ambas en 9p21 y ganancias de *JAG1* en 20p12.2 (Figura 20A). El análisis TCGA a través de cBioportal apoyó nuestros datos, ya que mostró una fuerte asociación entre las

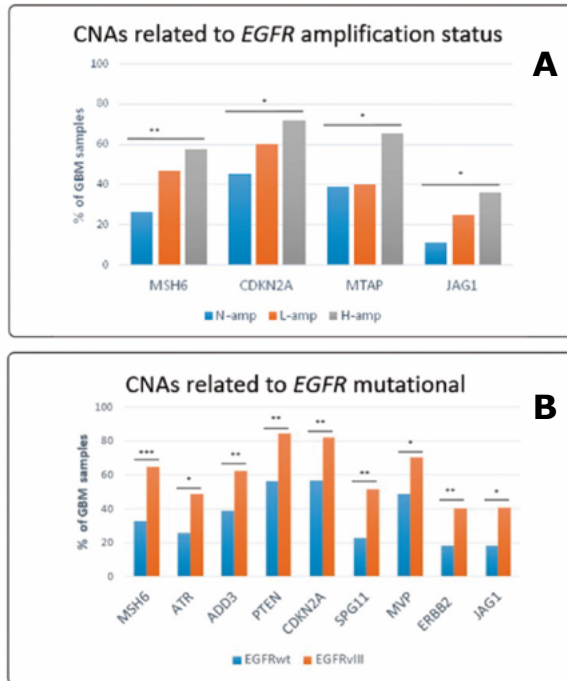


Figura 20. SCNAs relacionados con el estado del gen *EGFR*. **A)** SCNA relacionados con el estado de amplificación de *EGFR*. *MSH6* $p = 0.007$, *CDKN2A* $p = 0.023$, *MTAP* $p = 0.017$ and *JAG1* $p = 0.029$. **B)** SCNA asociado con la presencia de *EGFRvIII*. *MSH6* $p = 0.001$, *ATR* $p = 0.019$, *ADD3* $p = 0.010$, *PTEN* $p = 0.002$, *CDKN2A* $p = 0.004$, *SPG11* $p = 0.003$, *MVP* $p = 0.032$, *ERBB2* $p = 0.008$, and *JAG1* $p = 0.013$. * se utilizó para $0,050 > p > 0,010$, ** para $0,010 > p > 0,001$ y *** para $p > 0,001$.

pérdidas de *CDKN2A* y *MTAP* y la ganancia/amplificación de *EGFR* ($p < 0,0001$ ***). Cabe destacar que ambos genes se encuentran en 9p21. Los datos de TCGA también mostraron una asociación estadística entre la ganancia/ amplificación *JAG1* y la ganancia/amplificación *EGFR* ($p < 0,0001$ ***). *MSH6* mostró alteraciones en un pequeño número de GB y no alcanzó un resultado significativo.

Con respecto a la variante mutada de *EGFR*, encontramos en nuestra serie que los casos de *EGFRvIII* mostraban SCNAs estadísticamente diferentes a sus contrapartes de *EGFRwt*: *MSH6* (2p16.3), *ATR* (3q23), *ADD3* (10q25.1), *PTEN* (10q23.31), *CDKN2A* (9p21), *SPG11* (15q21), *MVP* (16p11.2), *ERBB2* (17q12), *JAG1* (20p12.2) (Figura 20B). Las

vías de interacción se obtuvieron a partir del *software* en línea STRING (<https://string-db.org/>). El análisis funcional de estos genes reveló un valor p de enriquecimiento en PPI de $9.2e-06$ y una asociación no aleatoria con la regulación negativa de los procesos de adhesión célula-matriz (Tasa de Descubrimientos Falsos-FDR- de 0.00100).

3.3.2. Variación en el número de copias de MVP

Los cambios en el número de copias del gen *MVP*, determinados por MLPA, oscilaron entre 0,47 y 6,49 unidades relativas. De acuerdo con esto, los GB con pérdida de *MVP* fueron el 6,2%, el 37,2% fueron normales y el 56,3% presentaron ganancias en el número de copias de *MVP*. La expresión de MVP se estudió también mediante inmunohistoquímica y como se muestra en la Figura 21, hubo una buena correspondencia entre la expresión de MVP y los valores de dosis de genes.

Se encontró en las células tumorales otra interesante correlación entre los valores de KPS y los niveles de *MVP*. Los tumores del 77,8% de los pacientes con valores de KPS entre 80 y 100 (21/27), presentaron valores bajos de *MVP* sugiriendo una relación directa entre el buen estado de los pacientes al momento del diagnóstico y normal o niveles bajos de dosis del gen *MVP*.

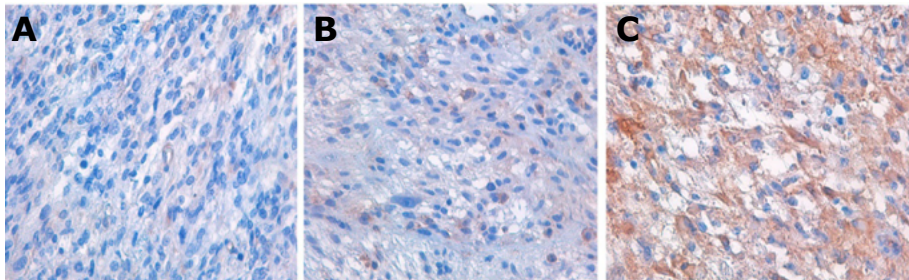


Figura 21. MVP inmunoespresión según su nivel de amplificación, utilizando secciones incluidas en parafina. **(A)** Células con baja expresión de MVP o ausencia de MVP expresión correspondiente a niveles de amplificación de MVP por debajo de 0,7 unidades relativas. **(B)** Células con expresión normal de MVP correspondiente a MVP niveles de amplificación entre 0,7 y 1,3 unidades relativas. **(C)** Células con alta expresión de MVP correspondiente a niveles de amplificación de MVP superiores a 1,3 unidades relativas. Cada micrografía es representativa de tres muestras de cada categoría de amplificación MVP. Ampliación 40x.

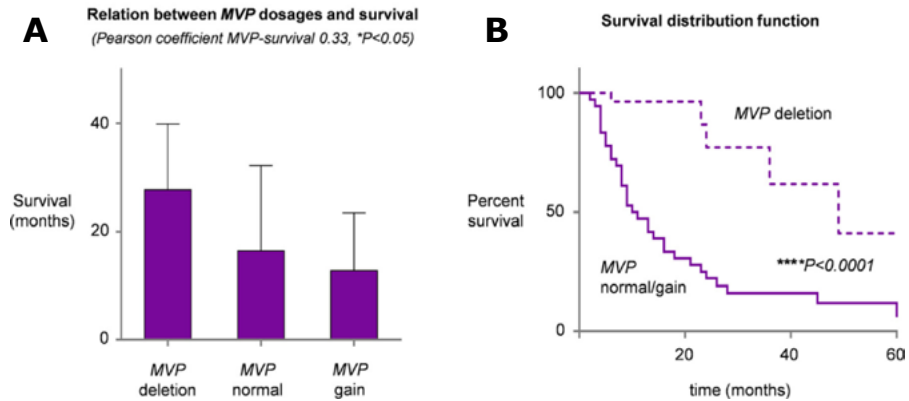


Figura 22. Relación entre las variaciones en el número de copias del gen MVP y la supervivencia. **(A)** Relación entre tres niveles de dosificación del gen MVP y la supervivencia de los pacientes tratados con quimioterapia. **(B)** Distribución de la supervivencia por el método de Kaplan-Meier que muestra el efecto en la supervivencia de pacientes con GB tratados con quimioterapia que tienen niveles bajos (deleción) y normales/altos de MVP (tumores sin deleción). **** $P < 0,0001$.

Los tumores derivados de pacientes tratados con quimioterapia que fallecieron durante el primer año después de la cirugía tuvieron un valor de dosis de MVP de $1,15 \pm 0,27$ ($N = 20$), los pacientes en las mismas condiciones terapéuticas que fallecieron durante el segundo año tuvieron un valor de MVP similar de $1,14 \pm 0,48$ ($N = 9$), y los pacientes con una supervivencia a largo plazo, más de dos años, mostraron un valor de dosis de MVP más bajo de $0,87 \pm 0,28$ ($N = 9$). La relación entre las dosis de MVP y la supervivencia se muestra en un histograma y en las curvas de supervivencia (Figura 22). Las diferencias entre las curvas de supervivencia de tumores con deleción de MVP y tumores sin deleción de MVP fueron significativas, a un nivel de $P < 0,0001$.

En la Tabla 7 se muestra la correlación entre varias alteraciones moleculares y el estado del gen MVP con o sin ganancias. De 64 GB con ganancias de MVP, 42 correspondieron a casos con EGFR amplificado y 22 sin amplificación de EGFR. Y, con respecto a la variante mutada de EGFR, el 74,3% de los tumores con EGFRvIII (26/35) también presentaban ganancias del gen MVP. Además, en el subconjunto de muestras con EGFRvIII con EGFR no amplificado, todos los GB de

MVP gene dosage (n° cases)				
Parameter	Specification	Amplification (MVP ≥ 1.3)	No amplification (MVP < 1.3)	Total
EGFRvIII	No	38	40	78
	Yes	26	9	35
EGFR	Gain	42	30	72
	Normal	22	19	41
SCNA	Gain	0	11	11
	Normal	21	25	46
PTEN	Loss	43	13	56
Total		64	49	113

Tabla 7. Correlación del estado de *EGFR* y la delección de *PTEN* con la dosis del gen *MVP* estudiado por MLPA.

pacientes masculinos mostraron una mayor amplificación de *MVP* (media ± SD: 2,34 ± 0,28, N = 5) con respecto a las mujeres (media ± SD: 1,44 ± 0.39, N = 3) y estas diferencias fueron significativas a un nivel de *P < 0.05 (prueba de Mann-Whitney).

3.3.3. Variación en el número de copias de *PTEN*

De las muestras de GB en estudio, el 59,3% presentaron el *PTEN* alterado, donde el 49,6% casos mostraron una delección de *PTEN* y el 9,7% presentaron ganancia o amplificación.

En nuestro estudio, la delección de *PTEN* se relaciona con niveles más altos de *MVP* (ver Tabla 7 y Figura 23). La relación inversa entre los valores de *MVP* y *PTEN* se demostró mediante un coeficiente de Pearson de 0,46 con un nivel de significancia de **P < 0,01. De manera recíproca, la ganancia o amplificación de *PTEN* fue incompatible con la ganancia de *MVP*.

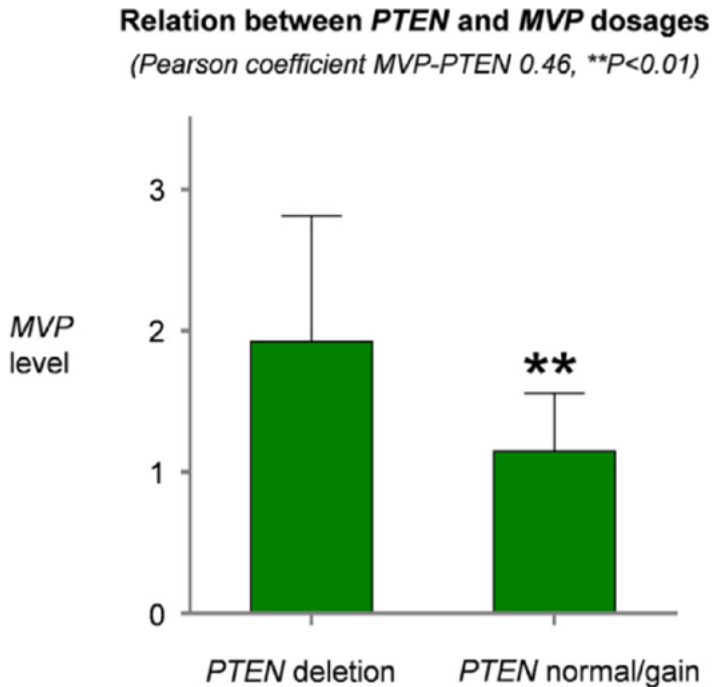


Figura 23. Relación entre la presencia o ausencia de delección de *PTEN* y los niveles de dosis génica *MVP*. Los datos se expresan como media \pm SD. ** $P < 0,01$.

3.3.4. Variación en el número de copias de *ADD3*

Detectamos alteraciones en *ADD3* en el 46,9% de los casos. Tiende a estar más alterado en mujeres (55,4% de los casos) que en hombres (40,3% de los casos).

En nuestro estudio encontramos una asociación estadística significativa entre la presencia de la variante mutada *EGFRvIII* y la delección de *ADD3* (Figura 20B).

Además, está asociado con la SG, ya que los pacientes con SCNA en *ADD3* mostraron una SG de $6,98 \pm 1,17$ meses mientras que los pacientes sin SCNA en *ADD3* mostraron una SG de $13,46 \pm 2,24$ meses ($p = 0,012^*$). El análisis de rango largo (Mantel-Cox) demuestra una asociación estadística ($p = 0,014^*$, Figura 24).

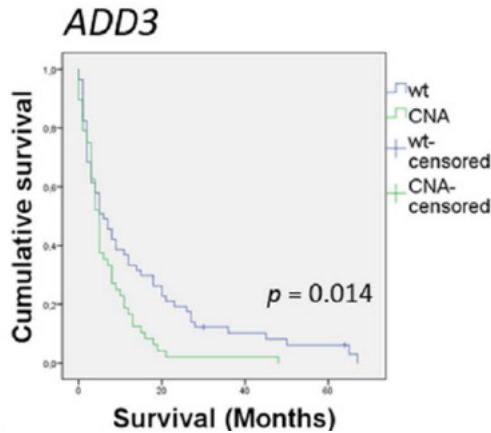


Figura 24. Asociación entre SCNA en *ADD3* y supervivencia global (SG). El eje Y representa el tiempo de supervivencia acumulado en términos de probabilidad: oscila entre 0 (0% de los casos) y 1 (100% de los casos). El eje X muestra el período de supervivencia, expresado en meses. La línea azul representa la supervivencia en pacientes con *ADD3* de tipo salvaje (media = 13,46 meses). La línea verde representa la supervivencia en pacientes cuyos tumores mostraron SCNA en *ADD3* (media = 6,98 meses). El análisis de rango largo (Mantel-Cox) demuestra significación estadística.

3.4. EGFR y vías de señalización

De todos los genes estudiados, los que están implicados en las vías de señalización más relacionadas con la amplificación o mutación de *EGFR* son los siguientes: *CDKN2A*, *MTAP*, *PTEN*, *MVP*, *JAG1*, *ATR* y *ERBB2*.

En la vía *CDKN2A/CDK4/RB1*, la proteína RB1 controla la progresión a través de G1 hacia la fase S del ciclo celular, y la pérdida de la función normal de *EGFR* puede resultar de la expresión alterada de cualquiera de estos genes (Figura 25). Encontramos una fuerte asociación entre las pérdidas de *CDKN2A* y *MTAP* y la ganancia/amplificación de *EGFR*.

En la vía *EGFR/RAS/NF1/PTEN/PI3K*, los receptores de crecimiento (por ejemplo, *EGFR*) se activan, lo que da como resultado el reclutamiento de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) a la membrana celular. PI3K fosforila el fosfatidinositol-4,5-bisfosfato (PIP2). PTEN

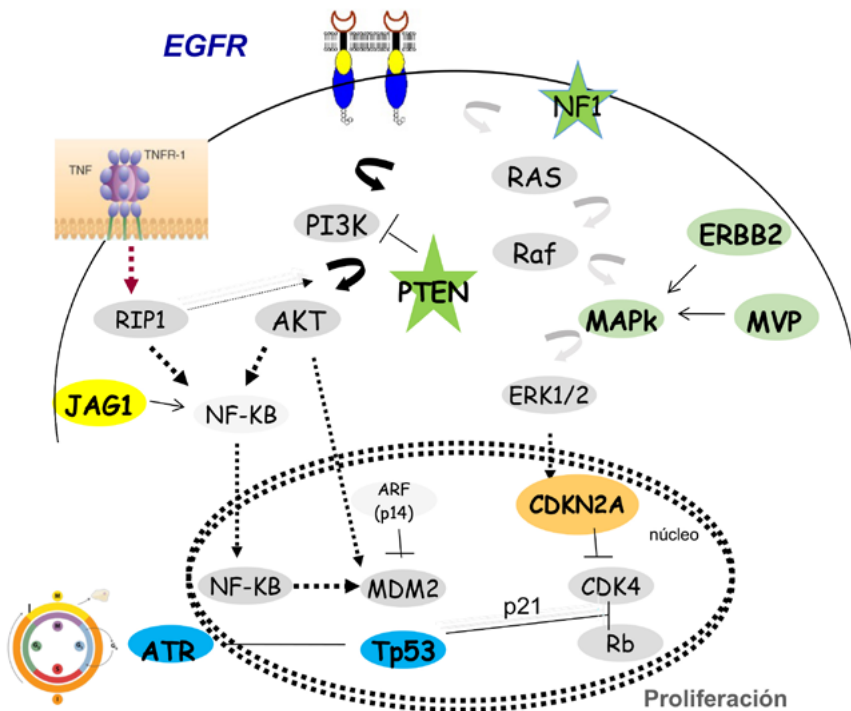


Figura 25. Esquema de las vías de señalización estudiadas en GBs.

inhibe la señal PIP3, inhibiendo así la proliferación celular (Figura 25). El gen supresor de tumores NF1 codifica la neurofibromina que funciona principalmente como un regulador negativo de RAS y también desempeña un papel en las vías mediadas por adenilato ciclasa y AKT-mTOR (Figura 25). En nuestro estudio encontramos una relación entre la presencia del *EGFRvIII* y la pérdida del gen supresor de **PTEN**.

En la vía TP53/MDM2/MDM4/p14ARF, el gen *TP53* codifica una proteína que desempeña un papel en varios procesos celulares, incluido el ciclo celular, la respuesta de las células al daño del ADN, la muerte celular y la diferenciación celular. Entre las vías relacionadas del gen **ATR**, se encuentran la señalización p53 y la regulación del daño del ADN/ATR del punto de control G1/S (Figura 25). Las mutaciones de *EGFR* están asociadas en nuestro trabajo a las deleciones de *ATR*.

Por otra parte, las proteínas codificadas por **MVP** y **ERBB2** puede desempeñar un papel en múltiples procesos celulares regulando las vías de señalización MAP quinasas (Figura 25). En este trabajo la variante mutada de *EGFR* se presentaba asociada a ganancias del gen *MVP* y del gen *ERBB2*.

Con respecto al gen **JAG1**, entre sus vías relacionadas se encuentran la señalización por GPCR y la vía de desarrollo mediada por NOTCH1 para la modulación de la actividad de NF-KB (Figura 25). Las ganancias de *JAG1* se presentaron asociadas tanto a la amplificación de *EGFR* como a su variante *EGFRvIII*.

Además, con respecto a la amplificación de *EGFR*, se construyó una red biológica donde se establecieron las interacciones entre las proteínas mediante el uso de la plataforma STRING¹⁷⁸. El análisis con la plataforma web STRING proporcionó un valor p de enriquecimiento de PPI (interacción proteína-proteína) de 0,000987 y se detectó una asociación de estos genes implicados con la activación de NOTCH3 y con una regulación negativa de la adhesión célula-matriz. Basándonos en un estudio previo publicado por Umehara, et al., 2019¹⁷⁹, analizamos en nuestra serie casos que presentaran triple SCNA (*EGFR*, *CDKN2A* y *PTEN*); encontrando su presencia en el 25,0% de los casos y mostraron una SG de $7,64 \pm 1,97$ meses, inferior a los $11,25 \pm 1,71$ meses en los casos sin triple SCNA.

3.5. Clasificación genética de glioblastomas: distribución de los casos en subgrupos

Con el objeto de identificar subgrupos en nuestra población de GB, se aplicó la clasificación de conglomerados jerárquicos a nuestros datos moleculares. Este análisis permitió distinguir tres grupos de GB (C1, C2 y C3) claramente diferenciados en base a los resultados genéticos (alteración/ no alteración). En la Tabla 8 se resumen los resultados de los marcadores moleculares en los tres subgrupos mencionados. En

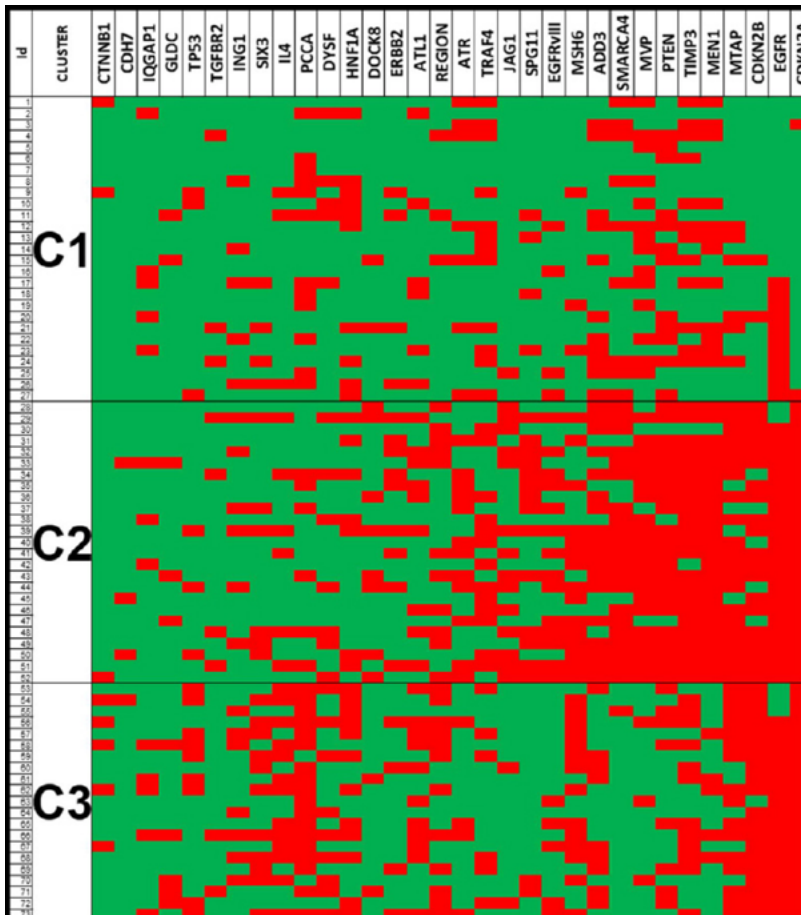


Figura 26. Análisis de agrupamiento. Mapa de calor de la clasificación jerárquica de los clústeres. Los pacientes incluidos están representados en el eje Y y los genes que contribuyeron al modelo en la X. Los cuadrados verdes no muestran SCNA, los cuadrados rojos muestran SCNA. Análisis de agrupamiento. Mapa de calor de la clasificación jerárquica de los clústeres. Los pacientes incluidos están representados en el eje Y y los genes que contribuyeron al modelo en la X. Los cuadrados verdes no muestran SCNA, los cuadrados rojos muestran SCNA.

este análisis se excluyó a 37 pacientes porque la información no estaba completa. De los 91 pacientes a clasificar, 18 eran sujetos inclasificables por la diversidad de las SCNAs encontradas y 73 se distribuyeron entre los tres diferentes grupos realizados. Los conglomerados mostraron cambios parcialmente superpuestos y otros completamente diferenciados entre ellos (Figura 26).

3. RESULTADOS

Genes Studied	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	p-Value
CTNNB1	11,1	8,0	28,6	0.120 (KW)
CDH7	0,0	12,0	4,8	0.166 (KW)
IQGAP1	18,5	12,0	23,8	0.581 (KW)
GLDC	7,4	12,0	23,8	0.254 (KW)
TP53	11,1	12,0	42,9	0.011* (Chi)
TGFBR2	11,1	16,0	9,5	0.781 (KW)
ING1	18,5	24,0	33,3	0.495 (Chi)
SIX3	14,8	24,0	52,4	0.014* (Chi)
IL4	14,8	24,0	66,7	<0.001 *** (Chi)
PCCA	44,4	24,0	85,7	<0.001 *** (Chi)
DYSF	18,5	28,0	42,9	0.180 (Chi)
HNF1A	37,0	28,0	57,1	0.124 (Chi)
DOCK8	7,4	32,0	9,5	0.036* (KW)
ERBB2	14,8	36,0	19,0	0.169 (Chi)
ATL1	22,2	36,0	52,4	0.096 (Chi)
ATR	25,9	48,0	19,0	0.080 (Chi)
TRAF4	44,4	52,0	28,6	0.268 (Chi)
JAG1	3,7	56,0	9,5	<0.001 *** (Chi)
SPG11	14,8	56,0	9,5	<0.001 *** (Chi)
EGFRvIII	14,8	56,0	23,8	<0.001 *** (Chi)
MSH6	11,1	60,0	66,7	<0.001 *** (Chi)
ADD3	40,7	72,0	42,9	0,048*(Chi)
SMARCA4	33,3	84,0	4,8	<0.001 *** (Chi)
MVP	51,9	84,0	14,3	<0.001 *** (Chi)
MTAP	22,2	84,0	76,2	<0.001 *** (Chi)
PTEN	44,4	88,0	38,1	<0.001 *** (Chi)
TIMP3	44,4	92,0	57,1	0.001 ** (Chi)
EGFR	40,7	92,0	85,7	<0.001 *** (Chi)
MEN1	44,4	96,0	23,8	<0.001 *** (Chi)
CDKN2A	7,4	100,0	100,0	<0.001 *** (Chi)

p-values were calculated by the (Chi), Pearson's chi-squared test χ^2 and (KW), Kruskal-Wallis test. To highlight statistical significance * was used for $0.050 > p > 0.010$, ** for $0.010 > p > 0.001$ and *** for $p \leq 0.001$.

Tabla 8. Análisis de agrupamiento (PCA) de GB IDHwt.

3.5.1. Características moleculares de los tres subgrupos de GB

Los diferentes subgrupos mostraron diferencias en su perfil molecular. Genéticamente, el análisis mostró que C1 fue el menos afectado, C2 mostró alteraciones de cerca de la mitad de los loci explorados en más del 50% de los casos, y C3 mostró una situación intermedia, con cerca del 30% de los genes incluidos afectados, en más del 50% de los casos. Cuando analizamos el estado de amplificación de *EGFR* por iFISH en relación con estos grupos, encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,007^{**}$): la mayoría de los casos de C1 fueron N-amp (63,0%) en comparación con un 28,0% y 19,0% en C2 y C3, respectivamente. La mayoría de los casos de C2 y C3 fueron H-amp (64,0% y 61,9%, respectivamente), en comparación con un 22,2% en C1. Esta distribución de los casos para el grupo L-amp fue más homogénea, representando 14,8%, 8,0% y 19,0% en C1, C2 y C3, respectivamente.

El clúster 2 mostró la mayor frecuencia de SCNAs en *CDKN2A*, *MEN1*, *EGFR*, *TIMP3*, *PTEN*, *MTAP*, *MVP*, *SMARCA4*, *ADD3*, *MSH6*, *JAG1*, *SPG11* y *DOCK8*. Con la finalidad de reconstruir la red de PPI (interacción proteína-proteína) de los genes con expresión diferencial (DEGs), se utilizó la base de datos STRING. El análisis de la función génica y la anotación de la vía usando este *software* mostró una red PPI significativa con un p-valor de 0,000522 y una asociación funcional con los procesos biológicos (PB) 'regulación de la adhesión célula-sustrato' (FDR) = $8.36e-05$, por *JAG1*, *CDKN2A*, *PTEN* y *MEN1*) y "adhesión célula-matriz" (FDR = 0.000522, por *JAG1*, *CDKN2A* y *PTEN*). Además, el análisis de la categoría del componente celular (CC) mostró una asociación significativa con la presencia de proteínas codificadas en diferentes partes de la célula, detectadas en la membrana plasmática (recuento en conjunto de genes: 5/1061), en la luz del orgánulo (recuento en conjunto de genes: 10/5162) y en la envoltura nuclear (recuento en conjunto de genes: 9/4359), todos con FDR = 0.0364, lo que sugiere un tráfico intenso de estas proteínas a través de la célula (Figura 31).

El clúster 3, al igual que el C2, mostró pérdidas en *CDKN2A* en el 100% de los casos, alta frecuencia de amplificación en *EGFR* y alteraciones de SCNA en *MTAP* y *MSH6*. Además, este C3 mostró SCNAs frecuentes en *TP53*, *IL4*, *PCCA* y *SIX3*. El análisis de STRING mostró una red PPI enriquecida con un p-valor de 0,0019 y una asociación con los procesos biológicos "regulación de la transición de fase del ciclo celular" con un FDR de 0,0060. Sin embargo, no se reveló ningún componente celular específico.

Finalmente, el clúster C1 fue el grupo menos alterado. Mostró un nivel más bajo estadísticamente significativo de alteraciones de *CDKN2A*, *MSH6*, *MTAP* y *EGFR* en comparación con sus contrapartes.

Aunque se observó una mayor supervivencia global entre los pacientes del grupo C3 (10,7 meses) que en el resto de grupos (7,2 meses y 5,9 para C1 y C2, respectivamente), esta diferencia no alcanzó niveles de significación estadística.

EGFRvIII y las pérdidas en *ADD3*, alteraciones asociadas a la supervivencia, se concentraron en el grupo 2. En concordancia, C2 mostró como se mencionó anteriormente, la supervivencia global (SG) más corta.

3.6. Alteraciones epigenéticas

Se evaluaron los niveles de metilación de las islas CpG presentes en las regiones promotoras de los genes *INK2A*, *PTEN*, *MGMT*, *TIMP-3*, *CDH1*, *GSTP*, *KRAS*, *MLH1*, *NFKB1* y *ARF1* utilizando la plataforma Sequenom MassARRAY. Para ello se utilizaron 36 GB y como control se utilizaron seis muestras de tejido no neoplásico.

Los niveles de metilación en los promotores de los genes *MGMT*, *KRAS* y *PTEN* en las muestras de GB excedieron a los de los tejidos cerebrales no neoplásicos, mientras que los promotores de los genes *ARF1*, *CDH1*,

CDKN2A y *GSTP* estaban mayoritariamente hipometilados, y los niveles de metilación de *MLH1*, *NFKB1* y *TIMP3* fueron similares a los de las muestras de control.

Se exploraron las asociaciones entre estos hallazgos y el estado de amplificación del gen *EGFR*.

3.6.1. Evaluación del estado de metilación del ADN y el estado de amplificación de *EGFR*

Los niveles de metilación de estos genes se analizaron con respecto al estado de amplificación del gen *EGFR*. De los 10 genes analizados, encontramos que solo la metilación del promotor *ARF1* se asoció significativamente con amplificación del gen *EGFR*. El nivel de metilación del promotor *ARF1* difería significativamente entre los grupos *EGFR* H-amp y *EGFR* L-amp en comparación con el grupo *EGFR* N-amp (valor

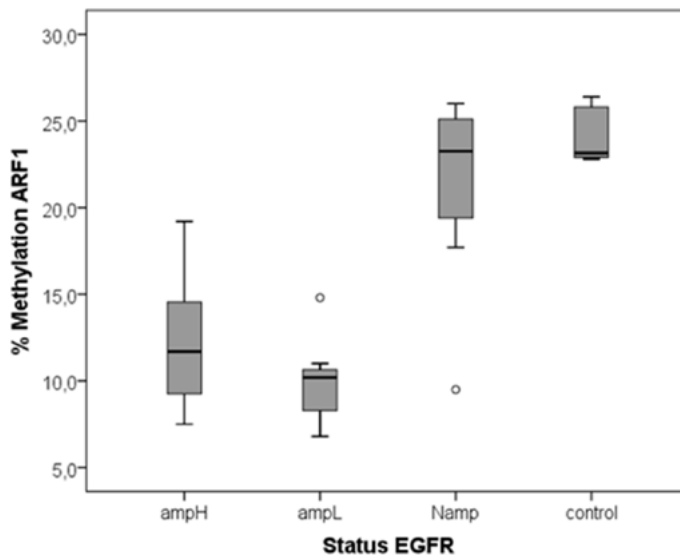


Figura 27. Diagramas de caja que representan el nivel de metilación del promotor *ARF1* relacionado con diferentes niveles de amplificación de *EGFR* en GB y tejidos de control no neoplásicos. Los recuadros denotan el rango intercuartílico, las líneas denotan la mediana y los bigotes indican la variabilidad fuera de los cuartiles superior e inferior. *EGFR* H-amp y L-amp con respecto a N-amp: valor de $p < 0,01$. Los círculos representan valores atípicos expresados como valores 1,5 veces fuera del rango intercuartílico.

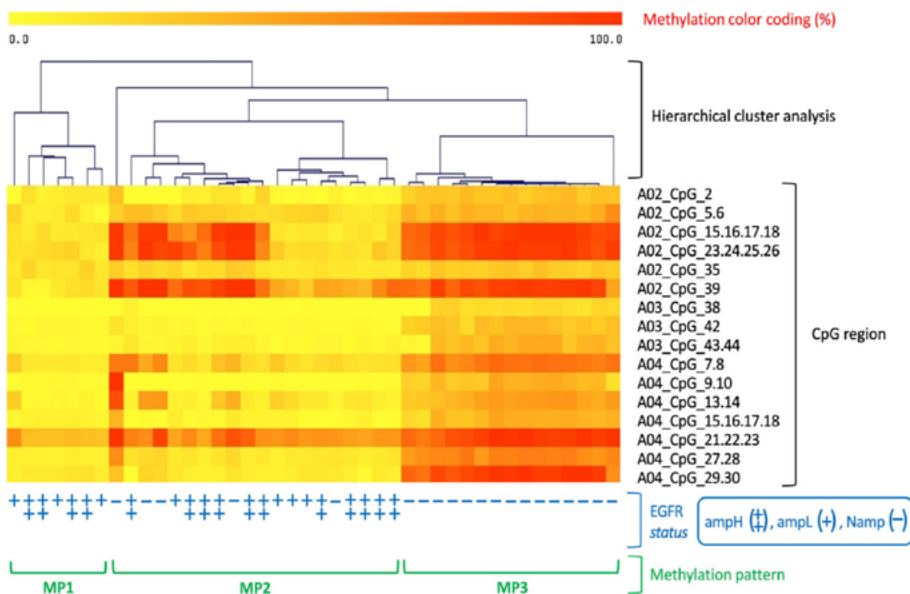


Figura 28. Mapa de calor de los niveles de metilación de las regiones CpG dentro del promotor del gen *ARF1*. Análisis de agrupamiento jerárquico de las muestras de GB que muestra tres patrones de metilación *ARF1* distintos (MP1, MP2 y MP3).

de $p < 0,01$). El nivel de metilación de *ARF1* era significativamente mayor (valor medio 21,9%) en el grupo de tumores sin amplificación de *EGFR* en comparación con los grupos con un nivel alto o bajo de amplificación de *EGFR* (valores medios 12,2% y 10,0%, respectivamente) (Figura 27).

Aplicamos análisis de agrupamiento jerárquico no supervisado al estado de metilación de los diversos sitios CpG presentes dentro de la región promotora de *ARF1* con el fin de explorar posibles asociaciones con los grupos de amplificación de *EGFR*. Calculamos la significación estadística de la agrupación mediante *bootstrapping*. El número máximo de agrupaciones que conservaban la significación estadística ($p < 0,01$) fue 3. Encontramos que los distintos patrones de metilación que surgieron en estos agrupamientos se relacionaban con los niveles de amplificación de *EGFR* en los GB (Figura 28). El patrón de metilación 1 (MP1), caracterizado por un nivel muy bajo de metilación de *ARF1*, se detectó solo en tumores con amplificación de *EGFR* (cuatro de ellos con nivel alto y tres con nivel bajo). El patrón de metilación 2

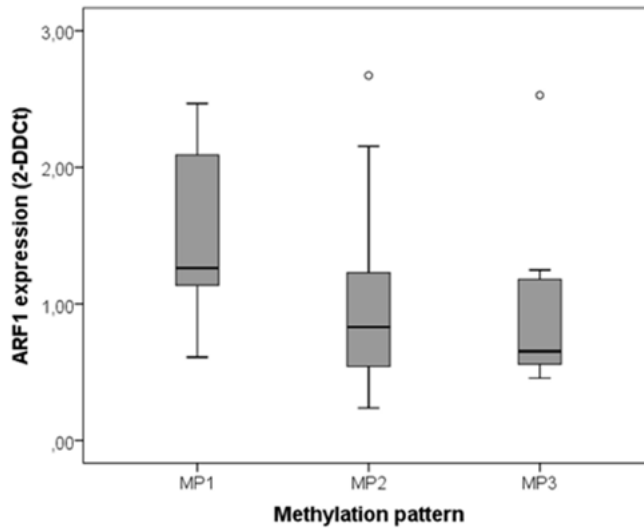


Figura 29. Niveles de ARNm de *ARF1* medidos por qRT-PCR en comparación con diferentes patrones de metilación del promotor del gen *ARF1*. Los recuadros denotan el rango intercuartílico, las líneas denotan la mediana y los bigotes denotan los percentiles décimo y noventa. Los círculos representan valores atípicos expresados como valores 1,5 veces fuera del rango intercuartílico.

(MP2), caracterizado por un nivel variable de metilación de *ARF1*, se detectó en 15 casos con diferentes niveles de amplificación de *EGFR* (once de ellos con nivel alto y cuatro con nivel bajo), pero también cinco casos sin amplificación de *EGFR*. El patrón de metilación 3 (MP3), caracterizado por un alto nivel de metilación de *ARF1*, se detectó solo en los casos sin amplificación de *EGFR* (15 casos), incluidas las seis muestras de tejido de control no neoplásicas.

3.6.2. La metilación del promotor *ARF1* se correlaciona con su expresión de ARNm

Para evaluar el impacto de la metilación del promotor en la expresión del gen *ARF1*, se cuantificó el nivel de expresión del ARNm mediante qRT-PCR (Figura 29). Encontramos que los tumores MP1 mostraron un aumento de más del doble en la expresión del ARNm de *ARF1* en comparación con los tumores del grupo MP2 y MP3 ($p < 0,05$). Las diferencias en los niveles de expresión de *ARF1* entre los tumores del grupo MP2 y MP3 no fueron estadísticamente significativas.

3.6.3. Amplificación de EGFR, metilación de ARF y perfiles metabólicos

Se midieron los perfiles metabólicos de las muestras de GB recogidas en este estudio, utilizando la técnica de espectroscopía de alta resolución "high resolution magic angle spinning spectroscopy" (HR-MAS). Usando esta técnica, obtuvimos espectros bien resueltos de muestras de tejido GB intactas, que mostraron diferencias de región espectral estadísticamente significativas entre las muestras del grupo *EGFR* H-amp, *EGFR* L-amp y *EGFR* N-amp, que se encontró que estaban asociadas con 15 metabolitos putativos (Figura 30).

Las diferencias observadas incluyeron concentraciones más altas de colina, fosfocolina, glutamato, glutatión total y uracilo, y concentraciones más bajas de ácidos grasos globales en muestras de GB con niveles

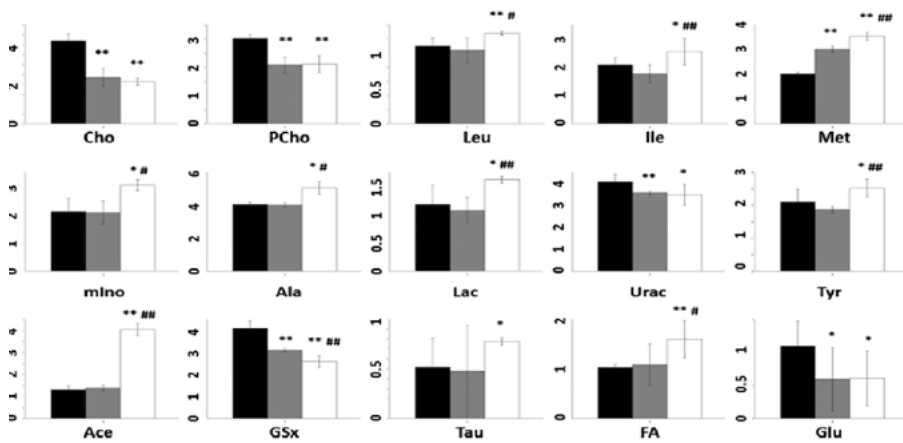


Figura 30. Perfiles metabólicos de GB según el estado de amplificación del gen EGFR (negro, alto nivel de amplificación; gris, bajo nivel de amplificación; blanco, sin amplificación). solo se presentan cambios metabólicos estadísticamente significativos. Los niveles se expresan como el área espectral del metabolito de interés dividida por el área espectral alifática total. *, valor de p con respecto al nivel alto del grupo de amplificación <0,05; **, valor de p con respecto al nivel alto del grupo de amplificación <0,01; #, valor de p con respecto al nivel bajo del grupo de amplificación <0,05; ##, valor de p con respecto al nivel bajo del grupo de amplificación <0.01. Cho: colina; PCho; fosfocolina; Leu, leucina; Ile, isoleucina; Met, metionina; mino, mioinositol; Ala, alanina; Lac, lactato; Urac, uracilo; Tyr, tirosina; Ace, acetato; GSx, glutatión total; Tau, taurina; FA, ácidos grasos totales (resto CH₂); Glu, glutamato.

altos de amplificación de *EGFR* en comparación con los otros dos grupos, encontrando una asociación positiva entre la amplificación del *EGFR* y diferentes precursores de membrana y metabolitos donantes de metilo. Estos datos indicarían que los niveles altos de amplificación de *EGFR* asociados a niveles bajos de metilación del promotor *ARF1* (MP1 y MP2) se correlacionarían con estos metabolitos.

Por otro lado, encontramos que la falta de amplificación de *EGFR*, que se asocia con un alto nivel de metilación del promotor *ARF1* (MP3), se asoció con niveles más altos de leucina, isoleucina, lactato, alanina, taurina, mioinositol, metionina y acetato, y niveles más bajos de tirosina.

4. ARTÍCULOS

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

Abstract—Glioblastoma (GBM) is the most frequent and malignant primary brain tumor. Conventional therapy of surgical removal, radiation and chemotherapy is largely palliative. Major vault protein (MVP), the main component of the vault organelle has been associated with multidrug resistance by reducing cellular accumulation of chemotherapeutic agents. With regard to cancer, MVP has been shown to be overexpressed in drug resistance development and malignant progression. The aim of the present study was to evaluate the MVP gene dosage levels in 113 archival samples from GBM and its correlation with patients' survival and epidermal growth factor receptor (EGFR) and phosphatase and tensin homolog (PTEN) gene dosages. Fluorescent *in situ* hybridization revealed polysomy of chromosome 7 in 76.1% of the GBMs and *EGFR* amplification in a 64.6% of the tumors. Genetic status of *EGFR*, *PTEN* and *MVP* copies was determined by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) technique. 31% of the tumors showed the *EGFR* is variant III mutation (*EGFRvIII*) mutation and 74.3% of them presented amplification of MVP gene. Amplification of *EGFR* and *MVP* was found in a 63.7% and 56.6% of the GBM, respectively. An inverse correlation between *MVP* and *PTEN* dosage values was observed. Besides, an inverse relationship between the survival of the patients treated with chemotherapy and the levels of *MVP* copies was determined. In conclusion, our study reveals an important role of *MVP*, together with *EGFRvIII* and *PTEN*, in the progression of GBM and proposes it as a novel and interesting target for new treatment approaches. © 2015 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

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).

INTRODUCTION

Glioblastoma (GBM) is the most common and most aggressive primary human brain malignancy (Furnari et al., 2007). The conventional therapy consists of surgical resection, radiotherapy and chemotherapy, with survival rates of 14.6 months (Stupp et al., 2009). Many pharmacological targets have been revealed, but for most patients, clinical response to targeted inhibitors are either not apparent or not durable (Cloughesy et al., 2014). New treatment approaches are urgently needed. For this reason, the molecular genetics of GBM are under intense investigation.

The epidermal growth factor receptor (EGFR) gene, located at 7p12.1, is frequently overexpressed, amplified and mutated in GBM (Ohgaki and Kleihues, 2007; López-Ginés et al., 2010; Verhaak et al., 2010). In this sense, *EGFR* has been identified to be a genetic alteration in 50–70% of GBM (Network C.G.A.R., 2008). The most common rearrangement of the *EGFR* is variant III mutation (*EGFRvIII*), an in-frame deletion of 801 base pairs spanning exons 2–7 of the EGFR gene (Nishikawa et al., 1994; Brennan et al., 2013) which encodes the ligand-binding domain of the receptor, generating a constitutively active oncogenic receptor tyrosine kinase (Huang et al., 2010) and, in turn, accelerating tumor growth (Inda et al., 2010). Additionally, EGFRvIII protein is more sensitive to EGFR tyrosine kinase inhibitors (Mellinghoff et al., 2005; Vivanco et al., 2012).

Phosphatase and tensin homolog (PTEN) gene, located at 10q23.3, has been shown to play an important role in GBM. A frequent genetic alteration in GBM is loss of heterozygosity at 10q, found in approximately 70% of the cases (Network C.G.A.R., 2008). Mutation of *PTEN* is also frequent in this tumor type (Ohgaki et al., 2004). Inactivation of *PTEN* can be attributed to gene mutation, loss of heterozygosity, promoter hypermethylation, microRNA-mediated regulation of gene expression and post-translational phosphorylation. Functional inactivation of the tumor suppressor protein PTEN has been detected in multiple cases of GBM and it has been shown to be closely linked to the

*Corresponding author. Address: Department of Pathology, Faculty of Medicine and Odontology, Universitat de València, Avenida de Blasco Ibañez 15, 46010 València, Spain. Tel: +34-96-386-41-46. E-mail address: rosario.gil-benso@uv.es (R. Gil-Benso).

† Both authors contributed equally to this work.

Abbreviations: EGFR, epidermal growth factor receptor; *EGFRvIII*, *EGFR* variant III mutation; FISH, fluorescent *in situ* hybridization; GBM, glioblastoma; GFAP, glial fibrillary acidic protein; HPFs, high-power fields; KPS, Karnofsky performance status; MLPA, multiplex ligation-dependent probe amplification; MVP, major vault protein; PTEN, phosphatase and tensin homolog.

during development, progression and prognosis of the disease (Ohgaki et al., 2004; Mellingerhoff et al., 2007).

Vaults are multi-subunit ribonucleoprotein cellular organelles that may be involved in nucleocytoplasmic transport (Scheffer et al., 1995). Major vault protein (MVP) is the main component of vaults and functions as a transport-associated protein that may be related with multidrug resistance by reducing cellular accumulation of chemotherapeutic agents (Scheffer et al., 1995). The MVP gene is located on chromosome 16 at position 16p11.2, close to the genes encoding for multidrug resistance-associated protein and protein kinase C- β , and the encoded protein can mediate drug resistance via a transport process (Xu et al., 1999). MVP can also play a role in multiple cellular processes by regulating the MAP kinase, JAK/STAT and phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathways (Steiner et al., 2006). Therefore, the expression of MVP may be a prognostic marker for several types of cancer (Van den Heuvel-Eibrink et al., 2000). Several reports have indicated a significant association between MVP expression and therapy response/patient prognosis of many types of tumors such as: breast cancer, myeloid leukemia, and non-small-cell lung cancer (Scheffer et al., 1995; Xu et al., 1999; Park, 2012). There are few studies reporting MVP expression in GBM (Tews et al., 2000; Lötsch et al., 2013). It is considered that increased expression of MVP can be of clinical value in predicting the response of tumors to chemotherapy (Hofer and Herrmann, 2001). Data on the clinical situation are still a matter of debate concerning how MVP is involved in clinical therapeutic failure (Steiner et al., 2006).

Because, at our understanding, few studies report the MVP expression in GBM and no previous studies are found concerning the analysis of MVP gene dosages variation, we considered the analysis of the status of MVP in human GBM and its relation with clinical and pathological prognostic factors. In addition, we explored its correlation with *EGFR* and *PTEN* alterations in this cohort of patients, in order to better characterize the genetic and molecular patterns of GBM.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Samples

Tumor samples were collected from 113 patients with GBM from the Clinic Hospital of Valencia. The study was reviewed and approved by Institutional Ethics Committee of the University of Valencia and Clinic Hospital of Valencia. All cases were newly diagnosed. None of the patients had received chemotherapy or radiotherapy before surgery. The Karnofsky performance status (KPS) was calculated at the time of diagnosis. All patients underwent subtotal surgical removal of the tumor, trying to accomplish the maximum extent of tumor elimination. Subsequently, radiotherapy with 50–65 Gy focal doses was applied to 65 patients. From them, 41 patients also received chemotherapy, including temozolomide or bis-chloroethylnitrosourea. Most of the chemotherapy patients received temozolomide. The oral chemotherapy drug was dispensed at 75 mg/m²/day

during radiation therapy and 150–200 mg/m²/day after radiation therapy on days 1–5, every 28 days. Six patients were treated with bis-chloroethylnitrosourea by using implantable drug-impregnated wafers, simultaneously with radiation therapy and afterward. Survival times were calculated from the day of diagnosis of the GBM to the end date of this study.

Histopathological studies

The tumor tissue was fixed in neutral-buffered formalin, embedded in paraffin, sectioned and stained with hematoxylin and eosin. The samples were categorized according to the WHO classification (Louis et al., 2007) and diagnosed as GBM. Mitotic index values were obtained by counting the total number of mitotic figures in the tumor cells in 10 high-power fields (HPFs) and in two different sections. The values are the mean number of mitoses per 10 HPF.

The immunohistochemical study was performed on paraffin-embedded sections using the avidin–biotin peroxidase method. The study was carried out using the antibodies: monoclonal mouse anti-human glial fibrillary acidic protein (GFAP) antibody (clone 6F2; Dako, Glostrup, Denmark), monoclonal mouse anti-human EGFR antibody (clone H11; Dako), which recognizes the wild-type EGFR and EGFRvIII and monoclonal mouse anti-human LRP (MVP) antibody (Santa Cruz, CA, USA). Proliferation index was evaluated using MIB-1 antibody staining (Dako) and was calculated by determining the percentage of immunopositive nuclei. The expression of EGFR was quantified according to the intensity of staining and number of staining cells, as: 0 (no staining), 1 (light or focal), 2 (moderate), and 3 (strong). Scores of 0 or 1 were defined as no overexpression and scores of 2 and 3 as overexpression (Shinojima et al., 2003).

Fluorescent *in situ* hybridization (FISH)

For FISH analyses, GBM samples were studied using tissue microarrays. We removed four 0.6-mm cores from two different selected areas on the paraffin block in each case, using the Beecher Instruments Manual Tissue Arrayer I. To evaluate EGFR gene status in interphase cells, dual-color FISH analysis was performed using the probe LSI EGFR SpectrumOrange/CEP 7 SpectrumGreen Probe from Vysis (Abbott Laboratories, IL, USA). Hybridizations were performed according to the manufacturer's instructions. Counterstaining of nuclei was carried out using 4',6'-diamidino-2-phenylindole. Images were acquired using an ASI SD300 Spectracube mounted on an Axioplan 2 microscope (Carl Zeiss AG, Jena, Germany) equipped with a set of the appropriate filters.

For each sample, green and orange signals were counted in two different regions of a total of 200 non overlapping nuclei. The mean signal number for *EGFR* and *CEP 7* was calculated, followed by the calculation of the *EGFR/CEP 7* ratio. The *EGFR* signal was quantified as amplified in individual cells when the *EGFR/control* signal ratio was higher than two (Layfield et al., 2006). On the basis of the *EGFR* status, and the

amplification type, the GBM cases were categorized into three groups: (i) high-level *EGFR* amplification as double minute chromosomes (dmin), (ii) low-level *EGFR* amplification as insertions, (iii) no *EGFR* amplification (López-Ginés et al., 2010, 2011).

Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)

Biopsy punches from selected areas of paraffin blocks of each sample were used for DNA extraction with QIAmp DNA FFPE tissue kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA, USA). Quality and quantity of DNA samples was assessed and improved by ethanol standard precipitation when necessary. MLPA was performed to determine the copy number changes of *EGFR*, *PTEN* and *MVP*. SALSA MLPA kit P105-C1 lot 1008 and ME024-A1 lot 0210 were used following the manufacturer's instructions (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands). Briefly, DNA was denatured at 98 °C for 5 min and hybridized with the appropriate probemix at 95 °C for 1 min followed by 60 °C overnight incubation. Ligation reaction was done at 54 °C for 15 min followed by a step to inactivate ligase-enzyme. PCR was performed using SALSA PCR primer mix and SALSA polymerase and consisting of 35 cycles of 95 °C/30 s, 60 °C/30 s and 72 °C/1 min with a final step at 72 °C/20 min (all reagents were acquired from MRC-Holland). Fragments were separated by capillary electrophoresis in an ABI 310 Sequencer (Applied Biosystems, Inc, Foster City, CA, USA) and data analysis was made with Coffalyser excel-based software (MRC-Holland) (González et al., 2008). Values between 0.7 and 1.3 were considered as the normal genetic dose. Results below 0.7 or 1.3–2 were interpreted as deletion and low-level amplification of the genes, respectively. Values over two were referred to as high-level amplification (López-Ginés et al., 2011). As previously described (Jeuken et al., 2009), *EGFRvIII* was identified by assessing the average ratio for exons 2–7 probes and comparing it with the average ratio of exons 1, 8, 13, 17 and 22 probes, establishing the *EGFRvIII* ratio. Samples with *EGFRvIII* ratios below 0.8 were considered to harbor the *EGFRvIII* deletion variant.

DNA sequencing

IDH1 and IDH2 mutational status was determined by sequencing. The genomic regions spanning wild-type R132 of IDH1 and wild-type R172 of IDH2 were analyzed by direct sequencing using the following primers: IDH1f 5-CGGTCTTCAGAGAAGCCATT, IDH1r 5-GCAAAATCACATTATTGCCAAC, IDH2f 5-AGCCCAT CATCTGCAA AAC, and IDH2r 5-CTAGGCGAGGAG CTCCAGT, as previously described (Hartmann et al., 2009). Forward and reverse chains were analyzed on an ABI 310 Sequencer.

Statistical analysis

Several data are expressed as mean \pm S.E.M. Statistical differences were determined using the Mann–Whitney *U* test for groups of independent samples. Pearson

correlation coefficient was used to quantify the strength of linear association between ratings. Kaplan–Meier plotting and log-rank (Mantel-Cox) testing were performed to evaluate differences between survival curves. Data were analyzed with SPSS (version 22) software and GraphPad Prism 6 software. Significance was accepted at least at **P* < 0.05 level.

RESULTS

Clinical and histopathological data

Table 1 shows the main clinical features of the patients and the tumor samples reported in the present work. These 113 samples came from 64 male and 49 female patients, reflecting the male predominance among GBM patients. Patient age ranged from 21 to 78 years, with an average of 56 years. The tumor locations were: frontal in 21 patients, parietal in 21, temporal in 18, occipital in five, in *septum pellucidum/corpus callosum* in two, in thalamus in two, and, in two lobes in 44. The average of the tumor volumes was 76.17 mm³. Preoperative functional status was evaluated according to the KPS scale; from the available data: eight cases scored 100, 10 cases 90, nine cases 80, 37 cases 70, one case 60, and 10 scored 40. Upon initial diagnosis of GBM, the standard treatment consisted of maximal surgical resection in all patients. In addition, from the patients with available data about the treatment, 81.7% received radiotherapy and 51.2% received radiotherapy plus chemotherapy. Survival ranged from 12 days to 64 months, with a mean survival period of 13.9 months.

Histologically, all tumors demonstrated features of GBM with pleomorphic, astrocytic tumor cells, prominent vascular proliferation with angiodysplasia, pseudoglomerular patterns, and necrosis. The expression of GFAP was confirmed in neoplastic cells. The number of mitoses ranged between 0 and 20, with a mean value of six. The average of Ki-67 for the tumors was 31.6%; range: 5–80%. Expression of EGFR correlated with its gene dosage as follows: 100% of the high-amplified samples showed high expression levels of EGFR, whereas 90% of low-amplified and 93.1% of non-amplified *EGFR* tumors had normal expression of the gene (Fig. 1a–c).

FISH studies

EGFR gene amplification. All GBM were analyzed by FISH. Cells with *EGFR* amplification were seen in 73 tumors (64.6%), whereas 40 cases did not present *EGFR* amplification (35.4%). The kinds of amplification observed were: high-level amplification as dmin in 53 cases (72.6%) and low-level amplification with extra copies of *EGFR* inserted in the p or/and q arms of chromosome 7 in 20 cases (27.4%) (Fig. 1d, f).

Chromosome 7 copy number alterations. From the 113 studied GBM, 86 tumors showed a gain of chromosome 7 material (76.1%); from these, 79 cases had a trisomy of chromosome 7 (91.9%) and 7 cases

Table 1. Clinical features of the GBM reported cases and its correlation with *EGFR* forms and *MVP* gene dosage levels. Several clinical features of the patients or the tumors were analyzed and presented in this order: Sex of the patient with GBM, age of the patient with GBM at the moment of diagnosis, anatomical location of the tumors, size of the tumors in mm³, Karnofsky performance status (KPS), kind of treatment, survival of the patients since the day of surgery. The compendium of data corresponding to these categories was correlated and classified according to: (i) presence of only the wild-type form of *EGFR* gene (*EGFRwt*), (ii) presence of the mutated variant III form of *EGFR* gene (*EGFRvIII*), (iii) levels of *MVP* values under 1.3 relative units, as measured by MLPA (*MVP* < 1.3), (iv) levels of *MVP* values equal or over 1.3 relative units (*MVP* ≥ 1.3). All the means are presented with the standard deviation. *Abbreviations:* GBM, glioblastoma multiforme; *EGFR*, epidermal growth factor receptor; *MVP*, major vault protein

Clinical features	Total	<i>EGFRwt</i>	<i>EGFRvIII</i>	<i>MVP</i> < 1.3	<i>MVP</i> ≥ 1.3
Sex					
N° female/male	49/64	32/46	17/18	19/30	30/34
Age of diagnosis					
Mean ± σ (in years)	56.33 ± 13.26	55.61 ± 13.46	58.31 ± 12.76	56.45 ± 12.31	56.22 ± 14.19
Range (in years)	21–78	22–78	21–78	28–75	21–78
N° cases ≤ 45 years	21	18	3	10	11
N° cases > 45 years	76	53	23	36	40
Age data not available	16	7	9	3	13
Anatomical location (N° cases)					
Frontal	21	13	8	8	13
Parietal	21	14	7	11	10
Temporal	18	13	5	11	7
Occipital	5	5	0	2	3
Septum pellucidum/corpus callosum	2	1	1	2	0
Thalamus	2	1	1	0	2
In two lobes	23	20	4	10	14
Non determined location	20	11	9	5	15
Tumor size					
Mean (in mm ³)	76.17 ± 70.13	75.48 ± 74.66	78.02 ± 57.63	81.34 ± 76.33	70.44 ± 63.09
Mean cases ≤ 45 years	72.13 ± 69.62	74.81 ± 74.08	56.00 ± 45.25*	65.71 ± 84.12	78.54 ± 57.72
Mean cases > 45 years	77.05 ± 70.75	75.67 ± 75.65	80.34 ± 59.30	84.56 ± 75.59	68.54 ± 65.06
KPS score (N° cases)					
100	8	8	0	7	1
90	10	10	0	5	5
80	9	5	4	9	0
70	37	25	12	21	16
60	1	1	0	1	0
40	10	8	3	4	6
Non qualified	38	22	16	2	36
Treatment (N° cases)					
Only radiotherapy	25	15	10	5	20
Only chemotherapy	2	1	1	2	0
Radiotherapy + Chemotherapy	42	33	9	29	13
None	12	11	1	5	7
Non available data	32	18	14	8	24
Survival					
N° cases ≤ 1 year	55	40	15	26	29
N° cases between 1 and 2 years	15	11	4	9	6
N° cases > 2 years	10	7	3	8	2
Non available data	33	20	13	6	27

* Average from only two cases.

presented polysomy for this chromosome (8.1%). From the cases with extra copies of chromosome 7, a percentage of 51.2% also showed *EGFR* or *EGFRvIII* amplification (44/86). Alternatively, 90.3% of the GBM with *EGFR* amplification also showed trisomy or polysomy of chromosome 7 (65/72).

Molecular biology

EGFR gene amplification and mutation studied by MLPA. From the 113 GBM, 72 presented amplification of

EGFR gene (63.7%). The amplified cases were classified in low-level and high-level amplifications, as previously specified. A high-level of amplification was found in 54 GBM (75%) whereas a low-level was observed in 18 tumors (25%). In general, it was a good correspondence between the results of *EGFR* amplification as measured by FISH or MLPA techniques. Only four cases were controversial: two were diagnosed as low-amplified *EGFR* by FISH and high-amplified *EGFR* by MLPA; one was diagnosed as high-amplified *EGFR* by FISH and low-amplified *EGFR* by MLPA; the fourth one was diagnosed as low amplified by FISH and not amplified

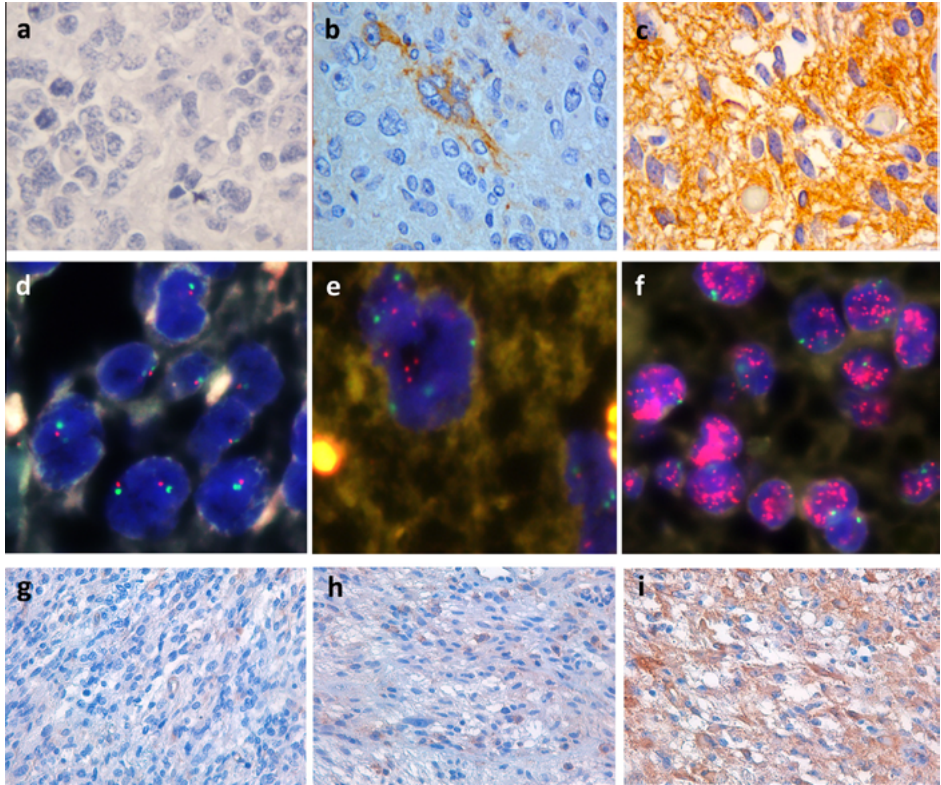


Fig. 1. EGFR expression and amplification and MVP expression in GBM. (a–c) EGFR immunoreactivity using paraffin-embedded sections. (a) Tissue without immunoreactivity. (b) Focal staining of EGFR, showing expression of several tumor cells whereas other are negative. (c) Strong staining. Magnification $\times 40$. (d–f) Patterns of *EGFR* amplification in GBMs. Fluorescence in situ hybridization in paraffin tissue sections. Probes for *EGFR* and centromere 7 were labeled with red and green respectively. (d) Non-amplified tumor cells. (e) Tumor cells with low-level amplification/copy number gains of *EGFR* and polysomy of chromosome 7. (f) Tumor cells showing high-level amplification of the *EGFR*. (g–i) MVP immunoreactivity according to its amplification level, using paraffin-embedded sections. (g) Cells with low MVP expression or absence of MVP expression corresponding to MVP amplification levels below 0.7 relative units. (h) Cells with normal MVP expression corresponding to MVP amplification levels between 0.7 and 1.3 relative units. (i) Cells with high MVP expression corresponding to MVP amplification levels over 1.3 relative units. Each micrograph is representative from three samples of each MVP amplification category. Magnification $\times 40$.

by MLPA. The explanation for these ambiguous results by both techniques can be related with the variability of the fraction of amplified cells in those samples depending on the studied tissue section. Moreover, it should be considered that the MLPA values for those cases were near the numerical limits established for the three MVP amplification categories.

The wild-type *EGFR* was maintained in 78 tumors (69%). From them, 45 (57.7%) showed amplification of this gene, with 29 cases (64.4%) showing a high level of *EGFR* amplification and 16 (35.6%) a low level.

The mutant *EGFRvIII* form was found in 35 GBM (31%). From these, 27 tumors (77.1%) also showed amplification of this gene and from them 25 samples showed a high level of amplification (92.6%) and two a low-level of amplification (7.4%).

Patients with tumors presenting only the wild-type *EGFR* form had, in general, higher values of KPS (mean \pm SD: 74.21 ± 17.92 , $N = 57$) than patients with *EGFRvIII* form (mean \pm SD: 67.37 ± 12.84 , $N = 20$). Additionally, as shown in Table 1, patients with KPS values of 90 or 100 correlated always with the wild-type *EGFR* form (18/18), thus suggesting a better condition of patients who did not present the mutation of the gene.

***PTEN* values.** From the 113 GBM samples, 51 cases showed a heterozygous deletion of *PTEN* (45.1%), and five cases had a homozygous deletion of this suppressor gene (4.4%). Gain of *PTEN* was found in six cases (5.3%), whereas four cases showed amplification (3.5%). Forty-seven cases presented normal gene doses (41.6%).

MVP values. The values of MVP gene dosage, determined by MLPA, ranged from 0.47 to 6.49 relative units. According to this, the 7 GBM with values under 0.7 relative units, were considered having a loss of MVP (6.2%), 42 cases with values between 0.7 and 1.3 were normal (37.2%), and 64 GBM exhibiting values equal or above 1.3 were considered having MVP amplification (56.6%). MVP expression was studied by immunohistochemistry in GBM samples from the three above-mentioned categories. As shown in Fig. 1g–i, there was a good correspondence between MVP expression and gene dosage values.

Table 2 shows the comparison between several tumor features (EGFR gene form, EGFR amplification level, PTEN deletions) and the cases grouped in: amplified MVP and non-amplified MVP tumors. From 64 GBM with MVP amplification, 42 corresponded to cases with EGFR amplified (33 cases with high-level amplification and nine with low-level) and 22 with normal dose of EGFR gene.

From these data, it is interesting that 74.3% of tumors with EGFRvIII (26/35) also had amplification of MVP gene (see Table 2). Moreover, in the subset of specimens with non-amplified EGFRvIII, all the GBM from male patients showed a higher amplification of MVP (mean \pm SD: 2.34 ± 0.28 , $N = 5$) with respect to the female ones (mean \pm SD: 1.44 ± 0.39 , $N = 3$) and these differences were significant at a level of $*P < 0.05$ (Mann–Whitney test).

It is also important to notice the different behavior of low-level amplified wild-type EGFR tumors depending on the sex of the patient: 85.7% of low-amplified EGFRwt tumors from female patients presented also MVP amplification (6/7), whereas the male ones showed the opposite pattern, exhibiting an 11.1% of MVP amplification and an 88.9% of tumors with normal values of MVP (8/9). Fig. 2a shows the differences between the MVP values of the female ones (1.96 ± 0.86 , $N = 7$) and the male ones (0.85 ± 0.31 , $N = 9$), which were statistically significant ($*P < 0.05$, Mann–Whitney test).

In our study, homozygous or heterozygous deletion of PTEN is related with higher levels of MVP (see Table 2 and Fig. 2b). From the 56 cases with PTEN deletion, the average value of MVP by MLPA was 1.9 relative units. Complementarily, 67.2% of the samples with MVP amplification (43/64) presented a deletion of PTEN, heterozygous (93%) or homozygous (7%). Differences between the MVP values of the cases with PTEN deletion (1.90 ± 0.92 , $N = 56$) and cases with normal dose or gain of PTEN (1.18 ± 0.49 , $N = 57$) were statistically significant ($**P < 0.01$, Mann–Whitney test). Inverse relationship between MVP and PTEN values was demonstrated by a Pearson coefficient of 0.46, with a level of significance of $**P < 0.01$.

In a reciprocal manner, PTEN gain or amplification was incompatible with the gain of MVP. The 11 registered cases with PTEN gain or amplification, corresponded with a low mean value of 0.69 relative units of MVP, as measured by MLPA.

Table 2. Correlation of EGFR status and PTEN deletion with MVP gene dosages. Clinical cases were classified into two groups: with amplified MVP ($MVP \geq 1.3$ relative units, as measured by MLPA), with non-amplified MVP ($MVP < 1.3$ relative units, as measured by MLPA). The compendium of data was classified and correlated according to: (i) presence of only the wild-type form of EGFR gene (EGFRwt), (ii) presence of the mutated variant III form of EGFR gene (EGFRvIII), (iii) absence of EGFR gene amplification by MLPA, (iv) presence of EGFR gene low-level amplification by MLPA, (v) presence of EGFR gene high-level amplification by MLPA, (vi) presence of PTEN gene deletions by MLPA, (vii) normal dose of PTEN gene by MLPA, (viii) presence of PTEN gene gain or amplification by MLPA. **Abbreviations:** EGFR, epidermal growth factor receptor; MVP, major vault protein; PTEN, phosphatase and tensin homolog

	MVP gene dosage (n° cases)		
	Amplification ($MVP \geq 1.3$)	No amplification ($MVP < 1.3$)	Total
Total	64	49	113
EGFRwt	38	40	78
EGFRvIII	26	9	35
Non-amplified EGFR	22	19	41
Amplified EGFR (low-level)	9	9	18
Amplified EGFR (high-level)	33	21	54
Deletion of PTEN	43	13	56
No deletion of PTEN	21	25	46
Gain of PTEN	0	11	11

Another interesting correlation between KPS values and MVP levels was found in tumor cells. The tumors from 77.8% of patients with KPS values among 80 and 100 (21/27), exhibited low values of MVP (see Table 1), thus suggesting a direct relation between good condition of the patients at the moment of diagnosis and normal or low levels of MVP gene dosage.

Since MVP expression has been related to resistance to chemotherapy, we studied the relation between MVP gene dosage levels and survival of patients treated with anticancer drugs. The factors which influence the survival of GBM patients are multiple and poorly understood, for that reason the study of survival is a complex matter to be considered carefully. In this case, 38 samples were included in the study, according to the completeness of their available data. The volume of residual cancer of the selected cases was less than 3%. The patients received chemotherapy drugs during radiation therapy and later, as detailed in the material and methods section.

IDH1 and IDH2 mutational status was determined. Eleven samples presented IDH1 mutation and none of the samples presented IDH2 mutation.

Tumors derived from patients treated with chemotherapy who died during the first year after surgery had a MVP dosage value of 1.15 ± 0.27 ($N = 20$), patients in the same therapeutic conditions who died during the second year had a similar MVP value of 1.14 ± 0.48 ($N = 9$), and patients with a

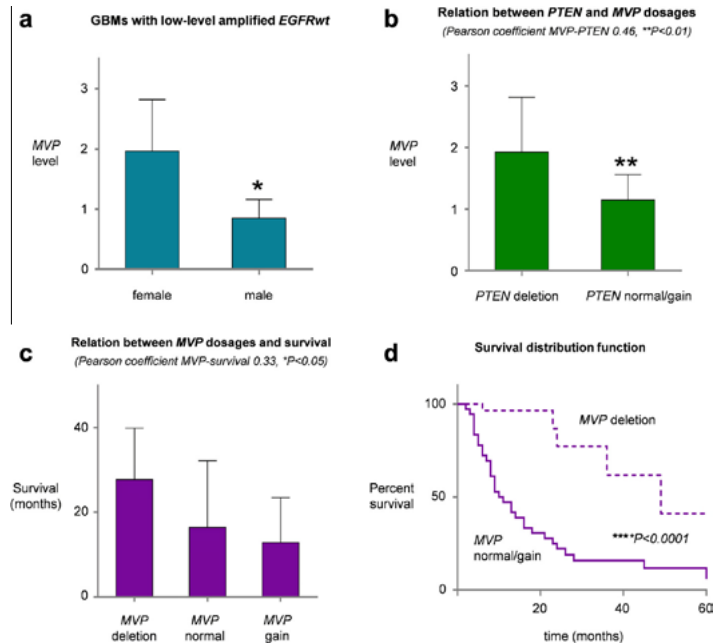


Fig. 2. Influence of MVP gene levels in three GBM features. MVP and *PTEN* gene dosages were determined by MLPA. Survival was expressed in months. (a) Relation between the sex of the patient and the levels of MVP gene dosage determined in GBMs with low amplification of *EGFRwt*. Data are expressed as mean ± S.E.M. **P* < 0.05. (b) Relation between the presence or absence of *PTEN* deletion and the levels of MVP gene dosage. Data are expressed as mean ± S.E.M. ***P* < 0.01. (c) Relation between three levels of MVP gene dosage and the survival of the patients treated with chemotherapy. (d) Kaplan–Meier survival distributions comparing survival of patients with GBMs having MVP deletion treated with chemotherapy and survival of patients without MVP deletion. *****P* < 0.0001.

long-term survival, more than 2 years, showed a lower MVP dosage value of 0.87 ± 0.28 ($N = 9$). In this last section we turn to Pearson correlation coefficient in order to explore the linear relation between ratings and their strength. A moderate but significant inverse correlation was determined between MVP values and the survival in months (Pearson correlation 0.33, **P* < 0.05, $N = 38$). The relationship between MVP dosages and survival is shown in a histogram (Fig. 2c) and in survival curves (Fig. 2d). Survival curves were plotted using the Kaplan–Meier method, and the log-rank test (Mantel–Cox) was used to evaluate differences between the subgroups. Differences between MVP-deleted tumors and MVP non-deleted tumors survival curves were significant, at a level of *****P* < 0.0001. IDH1 or IDH2 mutations' effect on survival in this correlation was minor, as only two samples from 38 of the group presented IDH1 mutation: one sample from a patient dying during the second year after surgery (MVP dosage = 1.23, month = 23) and one sample from a patient dying after 2 years (MVP dosage = 0.6, month = 49). No significant correlation was detected between MVP levels and survival of patients without chemotherapy.

DISCUSSION

GBM is the most malignant brain tumor entity in adults. Since tumor cells penetrate the surrounding brain tissue, complete surgical resection is practically impossible and despite these interventions the prognosis is still poor. In addition, intratumoral heterogeneity present in GBM contributes to cancer drug resistance by underlying mechanisms which are not well understood (Nathanson et al., 2013). New treatment strategies are needed, and these should be able to identify and kill dispersed tumor cells with great accuracy.

To date, excess of chromosome 7 is the most frequent genetic alteration in GBM (Louis et al., 2007; López-Ginés et al., 2010; Benito et al., 2010), and is considered a cause of the tumor initiation. This fact has been corroborated in the present study, in which trisomy or polysomy seven was found in 86 from 113 cases, as assessed by FISH. In addition, excess of chromosome 7 was related with *EGFR* amplification in more than 90% of the GBM analyzed.

MLPA technique has been used successfully in tumor diagnostics and in cancer research (Hömig-Hölzel and

Savola, 2012), and enabled us to determine the variations in gene dosage of EGFR, PTEN and MVP genes, and allowed the detection of deletions of *EGFR* that result in the *EGFRvIII* mutation.

We examined *EGFR* amplification of GBMs by FISH and MLPA. The results by both techniques were concordant except in four tumors. The explanation for these discrepancies is related to the existing variability of the fraction of amplified cells in those samples depending on the studied tissue section. In addition, *MVP* amplification values of those cases were near the numerical limits established for MLPA analysis.

It has been described that the expression of the mutated gene *EGFRvIII* in the absence of *EGFRwt* leads to the transformation of cells *in vitro* and correlates with poor prognosis in GBM (Nishikawa et al., 2004; Layfield et al., 2006; Louis et al., 2007). The absence of this mutant receptor in normal tissue makes *EGFRvIII* an attractive therapeutic target in GBM (Nishikawa et al., 2004). In our work, a percentage of 31% of analyzed GBM had *EGFRvIII* mutation. Interestingly, *EGFRvIII* is related with the amplification of *MVP* in approximately 75% of tumors (see Table 2). Moreover, if the samples with non-amplified *EGFRvIII* are considered, *MVP* is amplified in almost 90% of the tumors. These findings indicate a possible role of *MVP* in contributing to the poor prognosis predicted for GBM with *EGFRvIII* mutation. According to our results, no correlation was found between the three EGFR gene dosage previously defined categories (López-Ginés et al., 2010) and *MVP* gene dosages.

Available published data suggest that vaults and their components are frequently upregulated in a broad variety of multidrug-resistant tumors (Xu et al., 1999). Since drug resistance is one of the critical reasons leading to failures in cancer chemotherapies, the *MVP* knockdown appears to be a valuable approach to increase the access of drugs to the nucleus for a much more efficient cytotoxicity (Van den Heuvel-Eibrink et al., 2000). In addition, the expression of *MVP* correlated with the degree of malignancy in certain cancer types, suggesting a direct involvement in tumor development and/or progression (Lötsch et al., 2013). *MVP* values in cancer cell lines and tumors of different histological origin, including GBM, have been analyzed (Park, 2012; Lötsch et al., 2013). Based on the finding that *MVP* binds several phosphatases and kinases including PTEN, SHP-2 as well as ERKs, evidence is accumulating that *MVP* might be involved in the regulation of important cell signaling pathways including the PI3K/Akt and the MAPK pathways (Steiner et al., 2006).

In the present work, we provide a detailed analysis of *MVP* gene dosage in GBM samples from 113 patients, determined by MLPA. We registered only seven cases with a diminished number of *MVP* copies (6.2%), 42 cases were normal (37.2%), and 64 GBM samples showed increased values of *MVP* (56.6%), confirming previous findings (Scheffer et al., 1995). Interestingly, from 64 cases with augmented values of *MVP*, 67.2% of them (43 cases) presented deletion of *PTEN* as well, being the deletion of *PTEN* heterozygous in 93% of the cases, and homozygous in the remaining 7%.

Consequently, there is a significant inversely proportional relationship between *MVP* and *PTEN* gene dosage. In fact, the tumors with lower values of *MVP* corresponded with gains or amplifications of *PTEN*. From the eight registered tumors with *MVP* deletion: six had gain or amplification of *PTEN* and only one had a normal level of this gene.

It has been proposed that *MVP* expression would be related with the expulsion of chemotherapy drugs and, in turn, resistance to treatment and consequently lower survival (Scheffer et al., 1995; Xu et al., 1999). In this sense, patients treated with chemotherapy after resection showed an increased tendency for survival when a lower *MVP* gene dosage was determined in their removed tumor cells, this inverse relationship between *MVP* gene dosage and survival being statistically significant. The *MVP* average values were: 1.15 relative units in patients surviving less than 24 months, and 0.87 with a higher survival.

Summarizing, in the present work a relation was found between the presence of the *EGFRvIII* and *MVP* amplification, and between deletions of *PTEN* and increase of *MVP* values. In this sense, both the mutation of EGFR gene and the loss of a tumor suppressor gene like *PTEN* contribute to increase the aggressiveness of GBM by themselves, but additionally could be correlated with an increase of *MVP* gene copies.

Moreover, it has been described for the first time that low levels of *MVP* gene doses correlate with longer rates of survival in patients treated with chemotherapy, suggesting that increased number of copies of this gene may contribute to a lower efficiency of treatment and a worse prognosis of the tumor. This finding contributes to increase the evidence that *MVP* genetic overdose and subsequent overexpression interferes with the treatment by augmenting vault production and eliminating chemotherapy molecules. Taken together, our results suggest an important role of *MVP* in the poor response of GBM to chemotherapy and highlight this gene as a valuable factor in the prognosis of GBM tumors and a novel and interesting target for new treatment approaches.

CONCLUSION

The association of *MVP* amplification and *PTEN* deletion could be a potential biomarker in GBM. Meanwhile, further studies are needed to clarify the role of *MVP* in cancer therapy because molecular mechanisms of how *MVP* is involved in drug resistance have still not been fully answered.

DISCLOSURE/CONFLICT OF INTEREST

All authors have approved the final version of the article. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments—Supported by grants No. PROMETEO 2011-11/83 from the Generalitat Valenciana – Spain and No. P114/01669 from the Ministerio de Economía y Competitividad – Spain (Instituto de Salud Carlos III). We acknowledge to Fundación para la Investigación del Hospital Clínico de la

Comunidad Valenciana (INCLIVA). The funding sources have no involvement in the research and/or preparation of the article.

REFERENCES

- Benito R, Gil-Benso R, QUILIS V, Pérez M, Gregori-Romero M, Roldán P, et al. (2010) Primary glioblastomas with and without *EGFR* amplification: relationship to genetic alterations and clinicopathological features. *Neuropathology* 30:392–400.
- Brennan CW, Verhaak RG, McKenna A, Campos B, Noushmehr H, Salama SR, et al. (2013) TCGA research network. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 155:462–477.
- Cloughesy TF, Cavenee WK, Mischel PS (2014) Glioblastoma: from molecular pathology to targeted treatment. *Annu Rev Pathol* 9:1–25.
- Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, et al. (2007) Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev* 21:2683–2710.
- González JR, Carrasco JL, Armengol L, Villatoro S, Jover L, Yasui Y, et al. (2008) Probe-specific mixed-model approach to detect copy number differences using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). *BMC Bioinformatics* 9:261–276.
- Hartmann C, Meyer J, Balss J, Capper D, Mueller W, Christians A, et al. (2009) Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas. *Acta Neuropathol* 118:469–474.
- Hofer S, Herrmann R (2001) Chemotherapy for malignant brain tumors of astrocytic and oligodendroglial lineage. *J Cancer Res Clin Oncol* 127:91–95.
- Hömig-Hözel C, Savola S (2012) Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) in tumor diagnostics and prognostics. *Diagn Mol Pathol* 21:189–206.
- Huang PH, Miraldi ER, Xu AM, Kundukulam VA, Del Rosario AM, Flynn RA, et al. (2010) Phosphotyrosine signaling analysis of site-specific mutations on *EGFRvIII* identifies determinants governing glioblastoma cell growth. *Mol BioSyst* 6:1227–1237.
- Inda MM, Bonavia R, Mukasa A, Narita Y, Sah DW, Vandenberg S, et al. (2010) Tumor heterogeneity is an active process maintained by a mutant EGFR-induced cytokine circuit in glioblastoma. *Genes Dev* 24:1731–1745.
- Jeuken J, Sijben A, Alenda C, Rijntjes J, Dekkers M, Boots-Sprenger S, et al. (2009) Robust detection of EGFR copy number changes and EGFR variant III: technical aspects and relevance for glioma diagnostics. *Brain Pathol* 19:661–671.
- Layfield LJ, Willmore C, Tripp S, Jones C, Jensen RL (2006) Epidermal growth factor receptor gene amplification and protein expression in glioblastoma multiforme. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 14:91–96.
- López-Ginés C, Gil-Benso R, Ferrer-Luna R, Benito R, Serna E, González-Darder J, et al. (2010) New pattern of *EGFR* amplification in glioblastoma and the relationship of gene copy number with gene expression profile. *Mod Pathol* 23:856–865.
- López-Ginés C, Gil-Benso R, Monleón D, González-Darder J, Cerdá-Nicolás M (2011) Primary glioblastoma with different patterns of *EGFR* amplification and the relationship with gene expression profile. In: Garami M, editor. *Molecular targets of CNS tumors*. Rijeka: InTech Open. p. 485–514.
- Lötsch D, Steiner E, Holzmann K, Spiegl-Kreinecker S, Pirker C, Hlavaty J, et al. (2013) Major vault protein supports glioblastoma survival and migration by upregulating the EGFR/PI3K signalling axis. *Oncotarget* 4:1904–1918.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. (2007) WHO classification of tumors of the nervous system. 4th ed. IARC: Lyon.
- Mellinghoff IK, Wang MY, Vivanco I, Haas-Kogan DA, Zhu S, Dia EO, et al. (2005) Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *N Engl J Med* 353:2012–2024.
- Mellinghoff IK, Cloughesy TF, Mischel PS (2007) PTEN-mediated resistance to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors. *Clin Cancer Res* 13:378–381.
- Nathanson DA, Gini B, Mottahedeh J, Visnyei K, Koga T, Gómez G, et al. (2013) Targeted therapy resistance mediated by dynamic regulation of extrachromosomal mutant EGFR DNA. *Science* 343:72–76.
- Network C.G.A.R. (2008) Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455:1061–1068.
- Nishikawa R, Ji XD, Harmon RC, Lazar CS, Gill GN, Cavenee WK, et al. (1994) A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci* 91:7727–7730.
- Nishikawa R, Sugiyama T, Narita Y, Furnari F, Cavenee WK, Matsutani M (2004) Immunohistochemical analysis of the mutant epidermal growth factor, deltaEGFR, in glioblastoma. *Brain Tumor Pathol* 21:53–56.
- Ohgaki H, Kleihues P (2007) Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 170:1445–1453.
- Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, et al. (2004) Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* 64:6892–6899.
- Park K (2012) The role of major vault protein (MVP) in drug resistance. *J Control Release* 163:266.
- Scheffer GL, Wijngaard PL, Fiens MJ, Izquierdo MA, Slovak ML, Pinedo HM, et al. (1995) The drug resistance-related protein LRP is the human major vault protein. *Nat Med* 1:578–582.
- Shinojima N, Tada K, Shiraiishi S, Kamiyoy T, Kochi M, Nakamura H, et al. (2003) Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer Res* 63:6962–6970.
- Steiner E, Holzmann K, Elbling L, Micksche M, Berger W (2006) Cellular functions of vaults and their involvement in multidrug resistance. *Curr Drug Targets* 7:923–934.
- Stupp R, Hegi ME, Mason WP, et al. (2009) European organization for research and treatment of cancer brain tumour and radiation oncology groups; national cancer institute of Canada clinical trials group. *Lancet Oncol* 10:459–466.
- Tews DS, Nissen A, Külgén C, Gaumann AK (2000) Drug resistance-associated factors in primary and secondary glioblastomas and their precursor tumors. *J Neurooncol* 50:227–237.
- Van den Heuvel-Eibrink MM, Sonneveld P, Pieters R (2000) The prognostic significance of membrane transport-associated multidrug resistance (MDR) proteins in leukemia. *Int J Clin Pharmacol Ther* 38:94–110.
- Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, et al. (2010) Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in *PDGFRA*, *IDH1*, *EGFR*, and *NF1*. *Cancer Cell* 17:98–110.
- Vivanco I, Robins HI, Rohle D, Campos C, Grommes C, Nghiemphu PL, et al. (2012) Differential sensitivity of glioma- versus lung cancer-specific *EGFR* mutations to EGFR kinase inhibitors. *Cancer Discov* 2:458–471.
- Xu D, Arestrom I, Virtala R, Pisa P, Peterson C, Gruber A (1999) High levels of lung resistance related protein mRNA in leukaemic cells from patients with acute myelogenous leukaemia are associated with inferior response to chemotherapy and prior treatment with mitoxantrone. *Br J Haematol* 106:627–633.

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

Accepted: 12 May 2017
© International Society for Cellular Oncology 2017

Abstract

Purpose Glioblastoma (GB) is the most frequent and most malignant primary brain tumor in adults. Previously, it has been found that both genetic and epigenetic factors may play critical roles in its etiology and prognosis. In addition, it has been found that the epidermal growth factor receptor gene (*EGFR*) is frequently over-expressed and amplified in primary GBs. Here, we assessed the promoter methylation status of 10 genes relevant to GB and explored associations between these findings and the *EGFR* gene amplification status.

Methods Tumor samples were obtained from 36 patients with primary GBs. In addition, 6 control specimens

were included from patients who were operated for diseases other than brain tumors. The amplification status of the *EGFR* gene, and its deletion mutant *EGFRvIII*, were evaluated using FISH and MLPA, respectively. The *IDH1/2* gene mutation status was verified using Sanger sequencing. A commercial DNA methylation kit was used to assess the promoter methylation status of 10 pre-selected genes. Metabolic profiles were measured using HR-MAS NMR spectroscopy. The *EGFR* and *ARF1* mRNA expression levels were quantified using qRT-PCR.

Results Of the 10 genes analyzed, we found that only *ARF1* promoter hypermethylation was significantly associated with *EGFR* gene amplification. *ARF1* is a GTPase that is involved in vesicle trafficking and the Golgi apparatus. Subsequent tumor metabolism measurements revealed a positive association between *EGFR* amplification and different membrane precursors and methyl-donor metabolites. Finally, we found that *EGFR* gene amplifications were associated with distinct tumor infiltration patterns, thus representing a putative novel functional association between *EGFR* gene amplification and *ARF1* gene promoter methylation in GB.

Conclusions The results reported here provide a basis for a new hypotheses connecting *EGFR* gene amplification in GB cells with *ARF1* gene promoter methylation, vesicle trafficking, membrane turnover and tumor metabolism. The mechanism(s) underlying these connections and their functional consequences remain to be established.

Concha López-Ginés and Lara Navarro contributed equally to this work.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s13402-017-0329-5) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Concha López-Ginés
concha.lopez@uv.es

✉ Miguel Cerdá-Nicolás
jose.m.cerda@uv.es

- ¹ Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universitat de València, Avda Blasco Ibáñez 15, 46010 Valencia, Spain
- ² Fundación de Investigación del Hospital Clínico Universitario de Valencia / INCLIVA, Valencia, Spain
- ³ Unidad Central de Investigación en Medicina, Universitat de València, València, Spain
- ⁴ Servicio de Neurocirugía, Hospital Clínico Universitario de Valencia, Valencia, Spain
- ⁵ Departamento de Estomatología, Universitat de València, Valencia, Spain

Keywords Glioblastoma · *EGFR* amplification · *ARF1* · Metabolomics · DNA methylation

1 Introduction

Glioblastoma (GB) is the most frequent and most malignant primary brain tumor type in adults. The prognosis is still poor, despite the use of aggressive treatment regimens, and most patients die within one year of diagnosis [1]. Higher pre-operative Karnofsky Performance Scores (KPS) and younger age are predictors of a more favorable clinical course in the absence of radical surgery [2]. Even with surgery, GB cells that infiltrate the brain parenchyma often escape surgical resection and, as such, become the main cause of tumor recurrence.

Several genetic and epigenetic factors have been reported to play critical roles in the etiology and prognosis of GB. So far, however, they remain too poorly defined and too insufficiently characterized to be clinically relevant. The epidermal growth factor receptor gene (*EGFR*) is frequently amplified, overexpressed and sometimes mutated in primary GBs [3–5]. Previous *EGFR* gene copy number analyses have led to the delineation of three primary GB groups: GBs with a high level of *EGFR* amplification presenting as double minutes (dmin), GBs with a low level of *EGFR* amplification presenting as insertions into different loci on chromosome 7, and GBs without *EGFR* amplification [6]. Categorization into these groups has also implications for its biology, although its clinical relevance is still poorly understood.

Among the different factors that may affect tumor initiation and progression, DNA methylation is receiving increasing attention because of its heritability and its role in regulating gene expression. Aberrant gene promoter methylation may impair normal transcription and can thus result in abnormal cellular behavior which, in turn, may lead to cancer. Processes such as deregulated DNA repair, cell cycle progression and apoptosis, as well as cellular invasion and migration have been implicated in various cancers [7, 8]. Genes governing these processes, including *CDK2A*, *CDK2B*, *RB1*, *PTEN* and *TP53*, are frequently silenced in cancer due to promoter hypermethylation [9]. In GB the promoter methylation status of the O-6-methylguanine-DNA methyltransferase gene (*MGMT*) has been found to be important for predicting therapy response [10, 11]. *MGMT* gene promoter methylation is more commonly seen in secondary GBs [12, 13], suggesting that it may primarily play a role in tumor progression. Conversely, however, and in contrast to other tumor types, GBs often exhibit global DNA hypomethylation.

The effects of both genetic and epigenetic events on a cell's energy metabolism often drive its behavior. Therefore, novel cancer therapies are increasingly aimed at reprogramming this metabolism. This type of reprogramming may affect metabolic pathways essential for tumor growth and survival, such as the Kennedy (CDP-choline) pathway, anaerobic glycolysis, fatty acid oxidation and antioxidant production. In several cancer types it has been found that tumors with a more

aggressively augmented metabolism exhibit higher levels of metabolites associated with these aforementioned pathways [14–17]. High-throughput metabolite profiling (metabolomics) provides an unbiased assessment of these metabolic alterations and is particularly important in the search for biomarkers that may be used for in vivo diagnosis and prognosis in combination with other methods such as high-resolution magic angle spinning (HR-MAS) nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. Associations between well-established GB characteristics, such as *EGFR* gene amplification, and increased tumor metabolism may help us to better understand the phenotypic characteristics of cancer cells and to identify pathways relevant for cancer progression.

Here, we evaluated the promoter methylation status of genes known to be involved in the development of GB, including genes involved in the regulation of cell proliferation (*INK2A* and *KRAS*), cell senescence and apoptosis (*PTEN* and *NFKB1*), DNA repair and cell detoxification (*MGMT*, *MLH1* and *GSTP*) and tumor infiltration (*TIMP-3*, *CDH1* and *ARF1*) in 36 primary GBs, all of which were *IDH1/2* wild-type. We also evaluated the GB tumor metabolomics statuses in relation to different *EGFR* amplification levels using HR-MAS NMR spectroscopy.

2 Material and methods

2.1 Patients and tumor samples

Tumor samples were obtained from 36 patients with primary GB from the *Hospital Clínico Universitario* in Valencia. The samples were diagnosed by two different neuropathologists. Control specimens from six patients who were operated for diseases other than brain tumors were included as histologically normal brain tissue. This study was reviewed and approved by the clinical investigation ethics committee at the *Hospital Clínico Universitario*, and written informed consent was obtained from all the participants. The tissue retrieved from the patients during surgical resection was split into two samples, one for histopathological and immunohistochemical analysis and another one for molecular analysis, which was frozen and stored at -80°C until use.

The tumor tissue was fixed in neutral-buffered formalin for 48 h, embedded in paraffin, sectioned, and stained with hematoxylin-eosin (HE). The samples were then categorized according to the WHO classification criteria [18] and the GB diagnosis was confirmed. Mitotic index values were obtained by counting the total number of mitotic figures in the tumor cells present in 20 high-power fields (HPFs) and in two different sections. The values were reported as the mean number of mitoses per 10 HPF.

Immunohistochemistry (IHC) was performed on paraffin-embedded sections using an avidin-biotin-peroxidase complex method. IHC was carried out using antibodies directed against glial fibrillary acidic protein (GFAP) and Ki-67 (MIB-1), whereas a monoclonal mouse anti-human EGFR antibody (clone H11) was used to detect wild-type EGFR and its deletion-mutant (EGFRvIII) (all from Dako, Glostrup, Denmark).

The proliferation index (or labeling index, LI) was evaluated using MIB-1 antibody staining, and was calculated by determining the percentage of immunopositive nuclei. EGFR expression was scored according to the staining intensity and the number of stained cells using the following criteria: 0 (no staining), 1 (light or focal staining), 2 (moderate staining, present in 50% to 75% of the sample) and 3 (strong staining, present in more than 75% of the sample). Scores of 0 or 1 were defined as no over-expression, whereas scores of 2 and 3 were defined as over-expression [19].

2.2 Fluorescence in-situ hybridization

To evaluate the *EGFR* gene amplification status, dual-color fluorescence in-situ hybridization (FISH) was performed on tissue microarrays (TMAs) using the LSR *EGFR* Spectrum Orange/CEP 7 Spectrum Green Probe from Vysis (Abbott Laboratories, Downers Grove, IL, USA. Cat. No. 32–191,053). To construct TMAs, we removed four 0.6-mm cores from the corresponding tumor areas of the paraffin blocks in each case using a MTA-I manual tissue arrayer (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI, USA). Subsequently, the paraffin-embedded TMA cores were cut into 5- μ m sections that were mounted on Superfrost Plus microscope slides (Microm International, Walldorf Germany). Hybridizations were performed according to the manufacturer's instructions (Vysis) and the nuclei were counterstained with DAPI. Fluorescent signals were detected using a Leica DM400B photomicroscope equipped with an appropriate filter set. Signals were counted in 100–150 non-overlapping tumor cell nuclei. In each case the mean signal numbers for the *EGFR* gene and the control CEP 7 probe were calculated and used to determine the *EGFR*/CEP 7 ratio. The *EGFR* gene was considered to be amplified when the *EGFR*/CEP-7 signal ratio was >2 [20], although it was not possible to establish the exact ratio in cases with high amplification levels.

2.3 Multiplex ligation-dependent probe amplification

Biopsy punches from selected areas of the paraffin blocks of each sample were used for DNA extraction using a QIAamp DNA FFPE tissue kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA, USA). The quality and quantity of the samples was assessed and improved by standard ethanol precipitation when necessary. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) was performed to determine the amplification status of the mutant

EGFRvIII form exhibiting loss of exons 2 to 7; P105-C1 (lot 1008) and ME024-A1 (lot 0210). SALSA MLPA kits were used following the manufacturer's instructions (MRC-Holland, Amsterdam, Netherlands). MLPA fragments were separated by capillary electrophoresis in an ABI 310 Sequencer (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) and data analysis was performed using the Coffalyser excel-based MLPA analysis software (MRC-Holland).

2.4 Determination of *IDH1/2* mutation and DNA methylation status

Genomic DNA was extracted from 36 primary GBs and six non-neoplastic brain samples using a tissue DNA kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Subsequently, the catalytic domain of *IDH1* including codon 132 was amplified using the sense primer *IDH1* F: 5'-CGGTCTTCAGAGAAGCCATT-3' and the antisense primer *IDH1* R: 5'-GCAAAATCACATTATTGCCAAC-3'. The catalytic domain of *IDH2* including codon 172 was amplified using the sense primer *IDH2* F: 5'-AGCCCATCATCTGCAAAAAC-3' and the antisense primer *IDH2* R: 5'-CTAGCGGAGGAGCTCCAGT-3'. PCR was performed using standard buffer conditions. 200 ng of DNA and an AmpliTaq Gold Master Mix (Thermo Fisher Scientific) were employed for 40 cycles including denaturation at 94 °C for 45 s, annealing at 60 °C for 45 s and extension at 72 °C for 45 s in a total volume of 25 μ l. The PCR amplification product was analyzed on an ABI 310 Sequencer.

Sodium bisulfite conversion was performed using an EZ-96 DNA methylation kit according to the manufacturer's protocol (Zymo Research, Freiburg Germany) on 1 μ g of genomic DNA. For quantitative methylation measurements, we used a Sequenom's MassARRAY platform which utilizes MALDI-TOF mass spectrometry in combination with RNA base-specific cleavage (MassCLEAVE). PCR primers for amplification of different regions of the *ARF1*, *CDH1*, *CDKN2A*, *GSTP7*, *KRAS*, *MGMT*, *MLH1*, *NFKB1*, *PTEN* and *TIMP3* genes were designed using *Epidesigner* (Sequenom, San Diego, CA, USA). Whenever feasible, amplicons were designed to cover CGIs in the same region as the 5' UTR. For each reverse primer, an additional T7 promoter tag for in vivo transcription was added, as well as a 10-mer tag on the forward primer to adjust for melting-temperature differences. The PCRs were carried out in a 5 μ l format with 10 ng bisulfite-treated DNA, 0.2 units of *Taq* DNA polymerase (Sequenom), 1 \times supplied *Taq* buffer, and 200 mM PCR primers. Mass spectra were collected using a MassARRAY mass spectrometer (Bruker–Sequenom). The resulting spectra were analyzed using proprietary peak picking and signal-to-noise calculations after which the spectra's methylation ratios were generated using EpiTYPER software v1.2 (Sequenom, San Diego, CA, USA). After data filtering, a two-way ANOVA was

performed to identify CpG sites with significant levels of methylation across tumor types and to establish a correlation between DNA methylation level and *EGFR* amplification status.

2.5 The Cancer Genome Atlas (TCGA) data

Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 *EGFR* copy number data and Illumina Methylation27 data on 277 different GB samples were downloaded from The Cancer Genome Atlas [3, 21] data portal (<http://tcga-portal.nci.nih.gov>). The *EGFR* gene was considered to be amplified when the normalized log₂ ratio was ≥ 1.0 .

2.6 Metabolic profiling

Metabolic profiles were obtained from 33 GB samples using HR-MAS NMR spectroscopy, as described elsewhere [14]. Briefly, tissue samples were split from whole tumor masses preserved in liquid nitrogen. The mean sample weight was 23 ± 11 mg. All HR-MAS NMR spectra were recorded in a Bruker Avance DRX 600 spectrometer operating at a 1H frequency of 600.13 MHz. For all experiments, the samples were spun at 5000 Hz in order to maintain the rotation sidebands outside the acquisition window. To minimize the effects of tissue degradation, which would alter the metabolite composition of the biopsy, all the spectra were acquired at 277 K. A single-pulse pre-saturation experiment was acquired for all the samples. Immediately after the measurement, the samples were fixed in formalin for subsequent histopathological examination and for tumor content assessment by an expert pathologist. All HR-MAS NMR spectra were processed using MNova 5.3 (Mestrelab Research S.A., Santiago de Compostela, Spain) and transferred to MATLAB (MathWorks Inc) using in-house scripts for data analysis. Spectral signal integration by peak-fitting algorithms over relevant resonances provided the relative levels of the corresponding metabolites. Only signals with a peak-fitting residual error $< 15\%$ were used in the study (51 sets of resonance data). The statistical significance of the differences at the 0.05 probability level (*p*-value) was tested using an ANOVA test with Bonferroni correction for multiple testing.

2.7 Quantitative RT-PCR analysis

EGFR and *ARF1* mRNA expression levels were quantified using real-time reverse transcription-PCR (qRT-PCR) analysis in 29 tumors. The material left in the remaining samples was insufficient for determination by qRT-PCR. Briefly, 300 ng total RNA was reverse transcribed using a High-Capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems). *EGFR*_wt and *ARF1* were amplified using commercially available TaqMan probes (Hs01076078_m1 and Hs00734523_mL respectively;

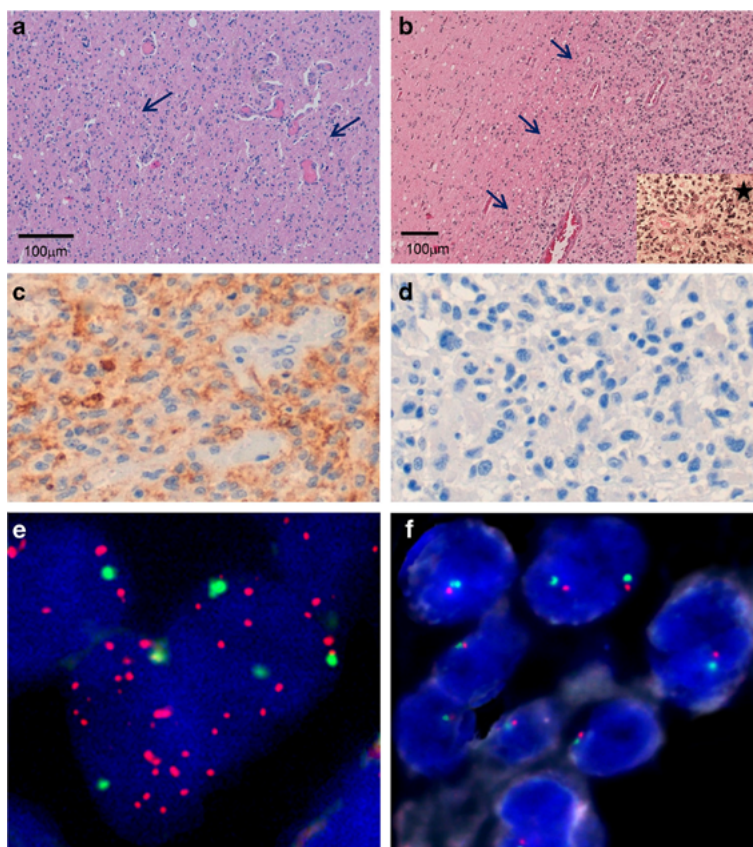
Applied Biosystems). The TaqMan Gene Expression Assays kit (Applied Biosystems) was used for real-time PCR analysis. All reactions were performed in triplicate and the results were automatically analyzed by the 7900HT fast real-time PCR system and RQ Manager v1.2 software (Applied Biosystems Inc.). The cycle threshold (Ct) values obtained by qPCR for all the samples were used to calculate the expression fold-change as $2^{-\Delta\Delta Ct}$. First, the *EGFR* and *ARF1* Ct values were normalized to the *ACTB* expression level (Ref: Hs9999903ml). Differences between *EGFR* and *ARF1* expression in the different *EGFR* amplification status groups (*EGFR*-ampH, *EGFR*-ampL, *EGFR*-Namp) were analyzed by one-way ANOVA and the non-parametric Kruskal-Wallis test, respectively. A *p*-value ≤ 0.05 was considered statistically significant.

3 Results

3.1 Patient population and histopathological characterization

A series of 36 primary GB cases, *IDH1/2* wild-type, was included in this study. From these, 23 were male and 13 female. The patients' ages ranged from 24 to 74 years, with a mean of 59.5 years (females 57.4 years and males 60.7 years). The tumor sizes ranged from 1.5 to 9.0 cm, and the mean diameter was 4.0 cm. All tumors were located in the supratentorial region. The overall survival rate of the patients was 11.4 months, with a mean of 10.5 months for females and of 11.9 months for males. Histologically, all tumors showed features of GB with pleomorphic astrocytic tumor cells, prominent microvascular proliferation and necrosis. GFAP expression was confirmed in the neoplastic cells in all cases. Two distinct infiltration patterns were observed: a diffuse infiltrative pattern and a nodular pattern. Only samples with more than 75% of the peripheral tumor contour analyzed were considered for infiltrative pattern analyses. The diffuse infiltrative pattern included a transition between high-density neoplastic cells in the center and diffuse and progressively decreasing numbers of neoplastic cells in the periphery of the tumor, which infiltrated the adjacent nervous tissue (Fig. 1a). In the cases with a nodular infiltrative pattern the front between high-density neoplastic cells and peripheral nervous tissue was delimited. In addition, isolated groups of neoplastic cells in perivascular spaces or in the neuropil, which were clearly separated from the tumor, were observed (Fig. 1b). In this study, 20 cases showed a diffuse infiltrative pattern and 8 cases showed a nodular pattern. In the remaining 8 cases the infiltrative pattern could not be established. The number of mitoses ranged from 1 to 12 (mean 4) and the mean MIB-1 LI of the tumors was 14.9% (range: 1–50%). Immunohistochemistry (IHC) analyses revealed that in 17

Fig. 1 Histopathology, immunohistochemistry and *EGFR* amplification (determined by FISH) in primary GB. **a.** Individually invading cells giving rise a diffuse pattern. Arrows point at areas showing the diffuse infiltration pattern (HE, obj. $\times 10$). **b.** Infiltration of groups of cells giving rise to a nodular pattern (HE, obj. $\times 10$) (arrows) with vascular hyperplasia and capillary pseudo-glomerulus (asterisk). **c.** Strong *EGFR* immune-expression (obj. $\times 20$). **d.** No *EGFR* immune-expression (obj. $\times 20$). **e.** Tumor cells showing a high level of *EGFR* amplification and **f.** cells without *EGFR* amplification, as determined by FISH



cases (47.2%) *EGFR* was over-expressed, whereas no detectable expression of this protein was noted 19 cases (52.8%) (Fig. 1c, d).

3.2 *EGFR* gene amplification correlates with *EGFR* expression

Thirty six primary GBs on the TMAs were successfully analyzed by FISH for *EGFR* copy number assessment. Based on this analysis, three different groups could be discerned: 1) high *EGFR* amplification (*EGFR*-ampH, 15 cases), 2) low *EGFR* amplification (*EGFR*-ampL, 7 cases) and 3) no *EGFR* amplification (*EGFR*-Namp, 14 cases) (Fig. 1e, f). The fraction of *EGFR* amplified cells in group 1 ranged from 20% to 90% with high gene copy numbers in each cell. The fraction of *EGFR* amplified cells in group 2 ranged from 5% to 20%, with low numbers of gene copies in the cells exhibiting amplification (3–16 copies). In group 3 no *EGFR*

amplification was present. Previously, this classification has been proven to be useful for studying *EGFR* amplification levels in both cultured cells and primary tumor tissues by FISH and cytogenetic analysis [6]. Using MLPA, wild-type *EGFR* was found to be present in 25 tumors and mutant *EGFRvIII* in 11 tumors. Of these latter tumors, 10 fell into the *EGFR*-ampH group and one in the *EGFR*-ampL group. No *EGFRvIII* mutant forms were detected in the *EGFR*-Namp group.

EGFR mRNA expression was quantified by qRT-PCR. Compared to the *EGFR*-Namp group, we found that the *EGFR*-ampH group tumors showed more than a 3.8-fold increase in *EGFR* mRNA expression. No increase in *EGFR* mRNA expression was detected in the *EGFR*-ampL group tumors compared to the *EGFR*-Namp group tumors (Supplemental Fig. S1). Therefore, we conclude that the *EGFR* mRNA expression in the *EGFR*-ampH group is significantly higher than in the other groups studied. The clinical

and histopathological features of the samples in relation to their different levels of *EGFR* amplification are shown in Table 1. Interestingly, we found that all cases that showed a nodular pattern exhibited a low or no *EGFR* amplification. IHC analysis of *EGFR* protein expression in the 36 GB samples revealed that also the *EGFR* protein was over-expressed in all 15 cases exhibiting a high *EGFR* gene amplification. In contrast, we found that of the 7 cases with a low *EGFR* amplification, only 1 showed *EGFR* protein over-expression. Similarly, we found that the *EGFR* protein was over-expressed in 1 out of all 14 cases without *EGFR* amplification.

3.3 *EGFR* gene amplification correlates with *ARF1* promoter methylation

The methylation levels of the CpG islands present in the promoter regions of the *INK2A*, *PTEN*, *MGMT*, *TIMP-3*, *CDHI*, *GSTP*, *KRAS*, *MLH1*, *NFKB1* and *ARF1* genes were evaluated using a Sequenom MassARRAY platform in 36 GB samples and 6 control non-neoplastic tissue samples. The methylation levels in the *MGMT*, *KRAS* and *PTEN* gene promoters in the GB samples exceeded those in the non-neoplastic brain tissues. The *ARF1*, *CDHI*, *CDKN2A* and *GSTP* gene promoters were found to be hypomethylated, with two exceptions, i.e., *EGFR*-ampL group samples showed higher *CDHI* methylation levels than controls, and the average *CDKN2A* gene promoter methylation level in the *EGFR*-Namp group was similar to that of the controls. The *MLH1*, *NFKB1* and *TIMP3* methylation levels were similar to those in the control samples (Table 2).

The methylation levels of these genes were also analyzed with respect to the *EGFR* gene amplification status. By doing so, we found that only the *ARF1* promoter methylation level differed significantly between the *EGFR*-ampH and *EGFR*-ampL groups compared to the *EGFR*-Namp group (p -value < 0.01). The *ARF1* methylation level was found to be significantly higher (mean value 21.9%) in the group of tumors without *EGFR* amplification compared to the groups with a

high or low level of *EGFR* amplification (mean values 12.2% and 10.0%, respectively). The methylation levels in all the control samples (mean value 24.0%) were similar to those obtained for GBs with no *EGFR* amplification (Table 2 and Fig. 2). Analysis of the TCGA GB dataset showed a moderate (but non-significant) relationship between the degree of *EGFR* amplification and the *ARF1* methylation status.

3.4 *ARF1* promoter methylation correlates with its mRNA expression

We applied unsupervised hierarchical cluster analysis to the methylation status of the various CpG sites present within the *ARF1* promoter region in order to explore potential associations with the *EGFR* amplification groups. We calculated the statistical significance of the clustering by bootstrapping. The maximum number of clusters retaining statistical significance ($p < 0.01$) was 3. We found that the distinct methylation patterns that emerged in these clusters related to the *EGFR* amplification levels in the GBs (Fig. 3). Methylation pattern 1 (MP1), characterized by a very low level of *ARF1* methylation, was detected only in tumors with *EGFR* amplification (four of them with high level and three with low level). Methylation pattern 2 (MP2), characterized by a variable level of *ARF1* methylation, was detected in 15 cases with different levels of *EGFR* amplification (eleven of them with high level and four with low level), but also five cases without *EGFR* amplification. Methylation pattern 3 (MP3), characterized by a high level of *ARF1* methylation, was detected only in cases with no *EGFR* amplification (15 cases), including the six non-neoplastic control tissue samples. To assess the impact of promoter methylation on *ARF1* gene expression, the *ARF1* mRNA expression level was quantified by qRT-PCR (Fig. 4). We found that the MP1 tumors showed more than a two-fold increase in *ARF1* mRNA expression compared to the MP2 and MP3 group tumors ($p < 0.05$). Differences in *ARF1* expression levels between the MP2 and MP3 group tumors were not statistically significant.

Table 1 Clinical, pathological and molecular findings in 36 primary GBs

<i>EGFR</i> status	Age (years)	Sex (F/M)	Size (cm)	Treatment	Survival (months)	Ki-67 (%)	<i>EGFR</i> IHC Score	Pattern of infiltration	<i>EGFR</i> wild/mutant
ampH 15 cases	48–74 x = 61 std.: 6.1	8/7	1.5–8.0 x = 4.8 std.: 1.7	RT + CH: 11 CH: 1 None: 3	2–27 x = 11.8 std.: 7.1	5–40- x = 16.1 std.: 24.7	3 (10cases) 2 (5 cases)	Diffuse: 10 cases NO: 5 cases	<i>EGFR</i> wild 5 cases/ <i>EGFR</i> vIII 10 cases
ampL 7cases	24–73 x = 53 std.: 17.2	1/6	1.5–7.0 x = 4.1 std.: 1.9	RT + CH: 5 None: 2	2–38 x = 21.1 std.: 15.6	3–21 x = 10.9 std.: 14.2	2 (1 case) 1 (3 cases) 0 (3 cases)	Diffuse: 4 cases Nodular: 1 case NO: 2 cases	<i>EGFR</i> wild 6 cases/ <i>EGFR</i> vIII 1 case
Namp 14 cases	24–74 x = 55 std.: 9.3	3/11	2.0–9.0 x = 4.3 std.: 1.9	RT + CH: 12 None: 2	1–38 x = 22.3 std.: 12.1	2–26 x = 10.6 std.: 11.1	2 (1 case) 1 (4 cases) 0 (9 cases)	Diffuse: 6 cases Nodular: 6 case NO: 2 cases	<i>EGFR</i> wild 14 cases

RT Radiotherapy, CH Chemotherapy, IHC Immunohistochemistry, NO not established, std. standard deviation

Table 2 Methylation levels of 10 pre-selected genes in 36 GB and 6 control samples exhibiting different *EGFR* amplification levels (H, L, N)

Cases		<i>ARF1</i>	<i>CDH1</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>GSTP7</i>	<i>KRAS</i>	<i>MGMT</i>	<i>MLH1</i>	<i>NFKB1</i>	<i>PTEN</i>	<i>TIMP3</i>
<i>EGFR</i> -ampH	Range	19.2–7.5	29.9–7.4	17.1–4.0	28.0–13.5	29.3–6.4	32.0–12.4	10.2–2.5	11.5–4.7	19.2–5.3	23.6–9.3
	Mean	12.2**	13.2	9.6	20.4	13.6	20.0	5.9	6.6	10.8	13.9
	std	3.7	6.0	4.4	4.6	6.2	6.8	1.9	2.1	4.6	4.0
<i>EGFR</i> -ampL	Range	14.8–6.8	32.9–6.6	14.3–3.8	39.2–13.3	29.2–6.6	47.7–13.9	9.0–3.3	9.8–5.7	19.5–5.7	16.1–9.6
	Mean	10.0**	19.6	10.5	21.6	10.8	24.0	5.0	7.8	9.4	12.8
	std	2.5	11.3	3.5	9.9	7.5	10.5	1.7	1.6	4.3	2.4
<i>EGFR</i> -Namp	Range	26.0–9.5	22.8–6.2	35.1–3.5	38.0–13.6	33.3–6.3	36.3–8.8	13.5–2.5	8.7–4.7	23.3–5.5	23.1–9.0
	Mean	21.9	11.4	12.8	21.2	12.9	18.9	5.4	6.6	10.8	11.5
	std	4.3	4.4	7.6	7.1	7.4	8.9	2.8	1.1	5.9	3.4
Control	Range	26.4–22.8	22.7–6.4	16.3–9.2	31.4–13.8	14.8–7.1	7.6–6.5	10.3–2.6	7.8–5.1	8.2–6.1	15.4–10.1
	Mean	24.0	15.2	13.8	22.6	9.8	7.1	5.5	6.2	6.8	12.4
	std	1.5	5.7	2.5	6.4	2.4	0.5	2.5	0.9	0.7	1.6

Values in bold represent the ARF promoter methylation levels

***p*-value with respect the no amplification (*EGFR*-Namp) group < 0.01

3.5 *EGFR* gene amplification and *ARF1* promoter methylation correlate with metabolic reprogramming

The determination of metabolic profiles in tumor biopsies represents a powerful approach for exploring metabolic reprogramming. As part of this metabolic reprogramming, the Kennedy pathway, which regulates the production of phospholipids for membrane turnover, is upregulated in tumors and therefore represents both a strong metabolic cancer hallmark and an excellent tumor aggressiveness marker. The correlation between *EGFR* status and the Kennedy pathway is well established. Here, we used HR-MAS NMR spectroscopy

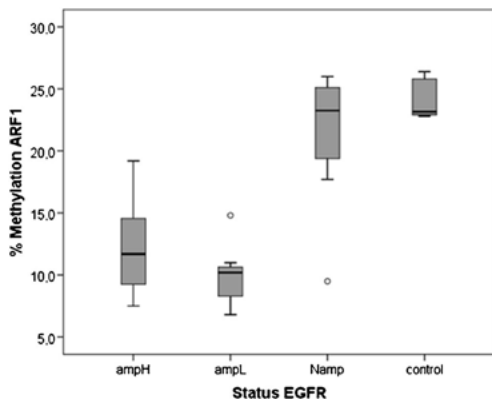


Fig. 2 Boxplots depicting the level of *ARF1* promoter methylation related to different *EGFR* amplification levels in GBs and non-neoplastic control tissues. Boxes denote the interquartile range, lines denote the median, and whiskers denote the tenth and ninetieth percentiles. *EGFR*-ampH and *EGFR*-ampL with respect to *EGFR*-Namp: *p*-value < 0.01. The circles represent outliers expressed as values 1.5 times outside the interquartile range

metabolomics to explore the potential implications of different *EGFR* amplification patterns in tumor metabolic reprogramming. Using this technique, we obtained well-resolved spectra of intact GB tissue samples, which showed statistically significant spectral region differences between the *EGFR*-ampH, *EGFR*-ampL and *EGFR*-Namp group samples, which were found to be associated with 16 putative metabolites (Fig. 5). The differences observed included higher concentrations of choline, phosphocholine, glutamate, total glutathione and uracil, and lower concentrations of global fatty acids in GB samples with high *EGFR* amplification levels (*EGFR*-ampH) compared to the other two groups. Interestingly, we found that high *EGFR* amplification levels correlated with low *ARF1* promoter methylation levels (MP1 and MP2). On the other hand we found that lack of *EGFR* amplification, which is associated with a high *ARF1* promoter methylation level (MP3; see above), was associated with higher levels of leucine, isoleucine, lactate, alanine, taurine, myo-inositol, methionine and acetate, and lower levels of tyrosine.

4 Discussion

GB is the most prevalent primary human brain tumor and is among the deadliest of all human cancers. GBs are characterized by alterations in genes that control cellular growth, apoptosis, angiogenesis and invasion [3, 4, 21]. Here, we detected statistically significant associations between *EGFR* gene amplification, *ARF1* promoter methylation, tumor infiltration and membrane turnover metabolism in primary GB samples. To the best of our knowledge, this is the first documentation of an association between *ARF1* methylation and GB biology. This work suggests a new component, *ARF1* methylation, in the chain of events that leads to the proliferation and invasion of

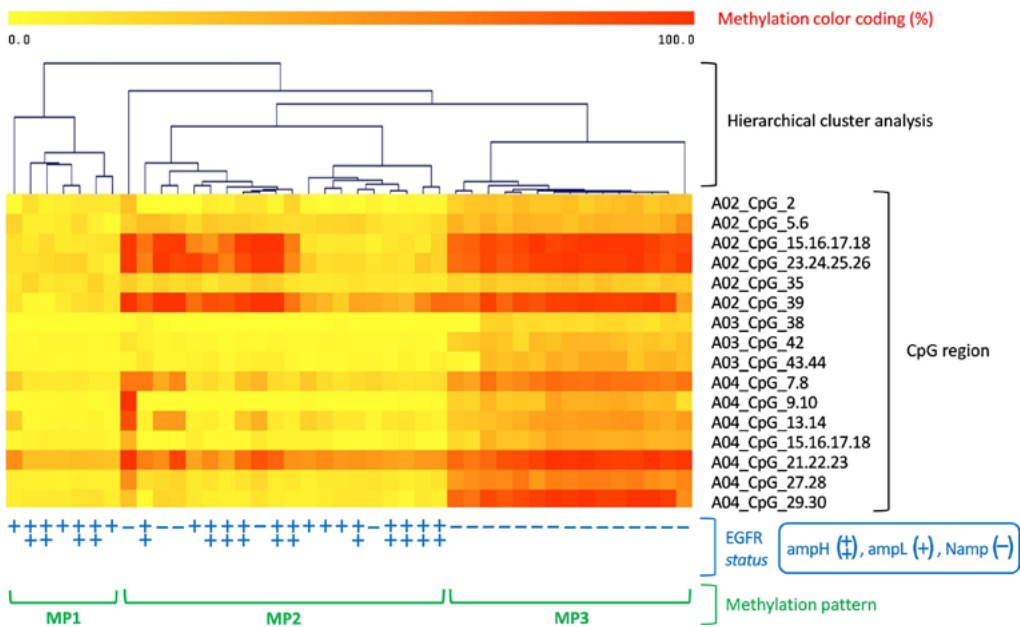


Fig. 3 Heatmap of the methylation levels of CpG regions within the *ARF1* gene promoter. Hierarchical cluster analysis of the GB samples showing three distinct *ARF1* methylation patterns (MP1, MP2 and MP3)

GB tumor cells. ADP-ribosylation factor (ARF) proteins constitute a small family of GTPases, encompassing six isoforms,

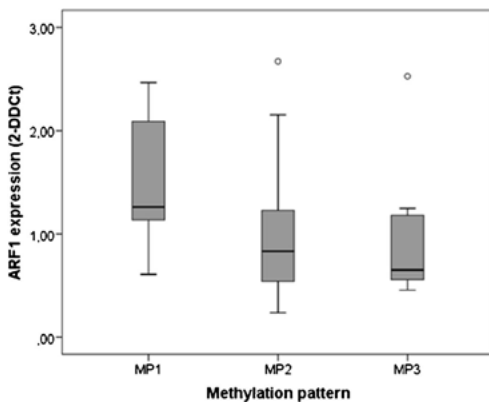


Fig. 4 ARF1 mRNA levels measured by qRT-PCR compared to different *ARF1* gene promoter methylation patterns. Boxes denote the interquartile range, lines denote the median, and whiskers denote the tenth and ninetieth percentiles. ARF1 mRNA expression was significantly higher in methylation cluster 1 (MP1) than in methylation clusters 2 (MP2) or 3 (MP3; $p < 0.05$). The ARF1 expression levels for the MP2 and MP3 samples did not exhibit statistically significant differences. The circles represent outliers expressed as values 1.5 times outside the interquartile range

which regulate vesicular traffic and organelle structure by recruiting coat proteins, regulating phospholipid metabolism and modulating the structure of actin at membrane surfaces. Among these proteins, ARF1 and ARF6 are best characterized. ARF6 is located in the plasma membrane and is involved in receptor endocytosis and actin remodeling, whereas ARF1 is classically associated with the Golgi apparatus [22]. During migration, intracellular signaling cascades promote actin cytoskeleton remodeling to form membrane protrusions, and small GTPases in the Rho and ARF families have been characterized as key players regulating this process [23–26]. The association between the ARF family of proteins and cancer has been well established in tumor cells in vitro [24, 27] and in primary malignancies including melanoma [28], lung cancer [29], breast cancer [30], gastric cancer [31] and neuroendocrine cancers [32]. As yet, however, the exact role of these proteins in these cancers remains unclear. High *ARF1* expression has frequently been observed in gastric cancer cells and to be significantly associated with tumor progression and advanced stages of disease, whereas low *ARF1* expression was found to be associated with a better prognosis [31]. Some of these associations may be related to PI3K pathway activation by ARF1 [24, 25]. In glioma cells, ARF6 over-expression has been found to enhance their migration [33, 34]. In breast cancer cells, ARF1 and ARF6 were found to be simultaneously activated following EGF stimulation [35, 36] and in glioma

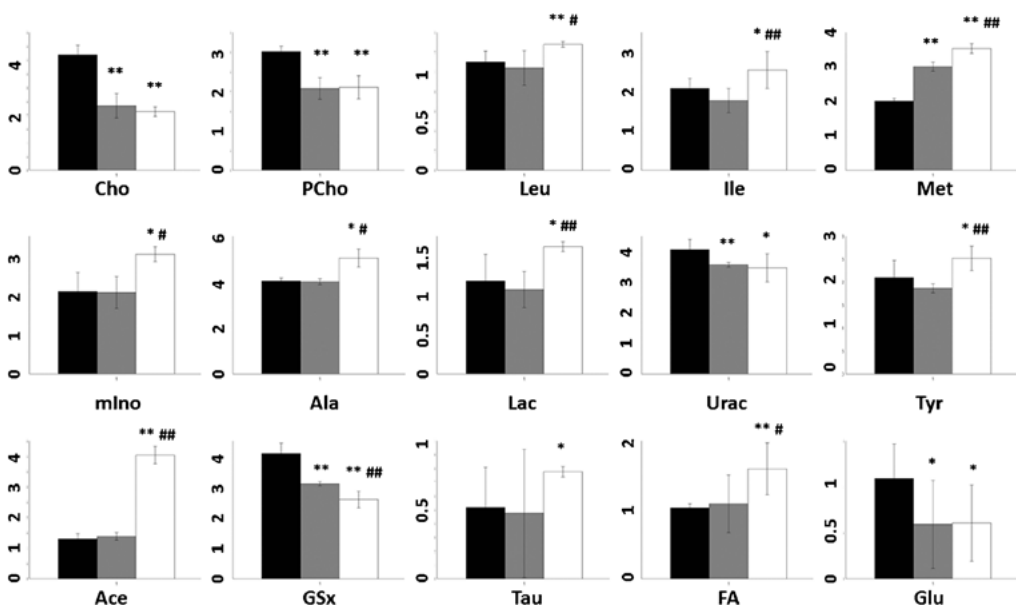


Fig. 5 Metabolomic profiles of GB according to *EGFR* gene amplification status (black, high level of amplification; gray, low level of amplification; white, no amplification). Only statistically significant metabolic changes are presented. Levels are expressed as the spectral area of the metabolite of interest divided by the total aliphatic spectral area. *, *p*-value with respect to the high level of amplification group < 0.05; **, *p*-value with respect to the high level of amplification group

< 0.01; #, *p*-value with respect to the low level of amplification group < 0.05; ##, *p*-value with respect to the low level of amplification group < 0.01. Cho: choline; PCCho: phosphocholine; Leu, leucine; Ile, isoleucine; Met, methionine; mlno, myo-inositol; Ala, alanine; Lac, lactate; Urac, uracil; Tyr, tyrosine; Ace, acetate; GSx, total glutathione; Tau, taurine; FA, total fatty acids (CH₂ moiety); Glu, glutamate

EGFR has been found to stimulate *ARF6* expression [37]. Here, we have uncovered associations between upregulated tumor metabolism and *EGFR* gene amplification, and between *EGFR* gene amplification and *ARF1* methylation, which supports a potential role for *ARF1* in GB progression. Our data show that *ARF1* gene promoter methylation closely regulates its expression and that this effect is enhanced in tumors exhibiting *EGFR* amplification.

The biological association between *EGFR* and *ARF1* is complex. *EGFR* is considered a major oncogenic protein since it can modulate the growth properties of transformed cells, survival signaling, migration, angiogenesis and metastasis. Our results indicate that *ARF1* promoter methylation and *EGFR* amplification are associated in GB. Interestingly, we found that GB entries in the TCGA also showed a trend towards a similar relationship, thus suggesting that our results are genuine. There are several possible explanations why a strong relationship was not found in the TCGA data. First, the TCGA dataset is inherently biased towards cases with large resections of highly viable tumors, whereas we included cases in our cohort regardless of sample size or degree of necrosis. Second, the copy number changes in the TCGA were determined by SNP array analysis and were reported as log₂

ratios (see **Material and methods**). While this analysis may in principle be analogous to FISH, it is difficult to extrapolate FISH cut-off points to SNP array data cut-off points. As cells migrate, intracellular signaling cascades are activated, and *ARF* families are key players in regulating this process. *ARF1* plays a well-recognized role in vesicle formation and also influences actin assembly at the Golgi apparatus to facilitate vesicle fission [22]. These processes are part of membrane trafficking and actin cytoskeleton remodeling, both of which impinge on the acquisition of migratory and invasive potentials of cells [25, 38]. In addition, it has been reported that *ARF1* may be present on plasma membrane ruffles along with *EGFR* [24, 36].

One of the most important issues in GB biopathology and developmental therapeutics is the identification of the mechanism(s) underlying tumor cell infiltration. GB tumor cells tend to invade into the surrounding tissues, either individually or in small groups, and previous studies in an orthotopic xenograft model have shown that GBs may display two types of growth behavior: (i) expansion of the tumor mass and (ii) formation of tumor nodules or highly diffuse single tumor cell infiltrations [39–41]. Many cases included in our study showed a diffuse infiltration pattern, mainly in the *EGFR*-ampH group, which

also exhibited a lower *ARF1* methylation, an observation that could be related to a more aggressive tumor behavior.

Our tumor metabolism data suggest that *EGFR* amplification and *ARF1* methylation are not only associated with changes in membrane turnover but also in membrane composition. It is thought that choline and inositol could play a dual role, both in increasing membrane turnover and in changing the ratios between different phospholipid membrane bilayer components, thus affecting its physicochemical properties. However, the observed association between *EGFR* amplification and tumor metabolism is not limited to membrane metabolites. Previous studies have shown that EGFR signaling mediated by PI3K/AKT upregulates a master lipogenic transcription factor, i.e., sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1), and to regulate pyruvate kinase M2 expression [42]. In addition, it has been reported that lactate production in GB cells allows them to become more invasive by mimicking a highly hypoxic metabolism via the Warburg effect [43]. Our data show that together all these metabolic shifts affect the production of methyl-donor metabolites, including leucine and isoleucine. The potential connection between these findings and other cellular processes such as DNA methylation and vesicle trafficking may be related to the role that *ARF1* plays in glioma progression, as described above. Therefore, the metabolic analysis of these tumors may suggest an association between *EGFR* amplification and different membrane precursors and methyl-donor metabolites. Our results indicate that *EGFR* amplification is associated with a complex network of interactions between membrane turnover, DNA methylation and vesicle trafficking, which is mediated by *ARF1*. We found that cases with a nodular growth pattern exhibited no or low *EGFR* amplification levels, whereas all tumors with high *EGFR* amplification levels and *ARF1* hypomethylation exhibited a diffuse growth pattern. Together, these results suggest an association between *EGFR* amplification and *ARF1* methylation, which may be correlated with tumor infiltration and metabolism. Although the mechanisms and consequences of these associations remain to be resolved, the findings reported here provide a basis for new hypotheses connecting vesicle trafficking, membrane turnover and metabolism in GB tumor cells.

Acknowledgements This work was supported by grants PROMETEO 2011-11/83 from the Generalitat Valenciana-Spain, PI14/01669 from the Ministerio de Economía y Competitividad-Spain (Instituto de Salud Carlos III), SAF2014-52875R from the Ministerio de Economía y Competitividad-Spain and PIE15/00013 from the Instituto de Salud Carlos III and FEDER. We acknowledge the Fundación para la Investigación del Hospital Clínico de la Comunidad Valenciana (INCLIVA).

Compliance with ethical standards

Disclosure of potential conflicts of interest All authors have approved the final version of the article. The authors declare that they have no conflict of interest.

Informed consent The present study was reviewed and approved by the clinical investigation ethics committee at the *Hospital Clínico Universitario*, and written informed consent was obtained from all individual participants included in the study.





References

1. M. Staberg, S.R. Michaelsen, R.D. Rasmussen, M. Villingshøj, H.S. Poulsen, P. Hamerlik, Inhibition of histone deacetylases sensitizes glioblastoma cells to lomustine. *Cell Oncol* **40**, 21–32 (2017)
2. C. Adamson, O.O. Kanu, A.I. Mehta, C. Di, N. Lin, A.K. Mattox, D.D. Bigner, Glioblastoma multiforme: A review of where we have been and where we are going. *Expert Opin Investig Drugs* **18**, 1061–1083 (2009)
3. TCGA (The Cancer Genome Atlas Research Network), Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* **455**, 1061–1068 (2008)
4. H. Ohgaki, P. Kleihues, The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res* **19**, 764–772 (2013)
5. H.J. Anderson, D.S. Galileo, Small-molecule inhibitors of FGFR, integrins and FAK selectively decrease L1CAM-stimulated glioblastoma cell motility and proliferation. *Cell Oncol* **39**, 229–242 (2016)
6. C. López-Ginés, R. Gil-Benso, R. Ferrer-Luna, R. Benito, E. Serna, J. González-Darder, V. Quilis, D. Monleón, B. Celda, M. Cerdá-Nicolás, New pattern of EGFR amplification in glioblastoma and the relationship of gene copy number with gene expression profile. *Mod Pathol* **23**, 856–865 (2010)
7. M. Berdasco, M. Esteller, Aberrant epigenetic landscape in cancer: How cellular identity goes awry. *Dev Cell* **19**, 698–711 (2010)
8. A. Portela, M. Esteller, Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol* **28**, 1057–1068 (2010)
9. M. Esteller, P.G. Corn, S.B. Baylin, J.G. Herman, A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* **61**, 3225–3229 (2001)
10. M.E. Hegi, A.C. Diserens, T. Gorlia, M.F. Hamou, N. de Tribolet, M. Weller, J.M. Kros, J.A. Hainfellner, W. Mason, L. Mariani, J.E. Bromberg, P. Hau, R.O. Miranoff, J.G. Cairncross, R.C. Janzer, R. Stupp, MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* **352**, 997–1003 (2005)
11. P. Bady, D. Sciuscio, A.C. Diserens, J. Bloch, M.J. van den Bent, C. Marosi, P.Y. Dietrich, M. Weller, L. Mariani, F.L. Heppner, D.R. McDonald, D. Lacombe, R. Stupp, M. Delorenzi, M.E. Hegi, 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**, 547–560 (2012)
12. B. Cadieux, T.T. Ching, S.R. Van den Berg, J.F. Costello, et al., *Cancer Res* **66**, 8469–8476 (2006)
13. S. Kreth, N. Thon, F.W. Kreth, Epigenetics in human gliomas. *Cancer Lett* **342**, 185–192 (2014)
14. D. Monleón, J.M. Morales, A. González-Segura, J.M. González-Darder, R. Gil-Benso, M. Cerdá-Nicolás, C. López-Ginés, Metabolic aggressiveness in benign meningiomas with chromosomal instabilities. *Cancer Res* **70**, 8426–8434 (2010)

15. E. Serna, J.M. Morales, M. Mata, J. González-Darder, T. San Miguel, R. Gil-Benso, C. López-Ginés, M. Cerdá-Nicolás, D. Monleón, Gene expression profiles of metabolic aggressiveness and tumor recurrence in benign meningioma. *PLoS One* **8**(6), e67291 (2013)
16. N. Auslander, K. Yizhak, A. Weinstock, A. Budhu, W. Tang, X.W. Wang, S. Ams, E. Ruppin, A joint analysis of transcriptomic and metabolomic data uncovers enhanced enzyme metabolite coupling in breast cancer. *Sci Rep* **6**, 29662 (2016)
17. S. Walenta, N.F. Voelxen, W. Mueller-Klieser, Lactate—an integrative mirror of cancer metabolism. *Recent Results Cancer Res* **207**, 23–37 (2016)
18. D.N. Louis, A. Perry, G. Reifenberger, A. Deimling, D. Frigarella-Branger, W.K. Cavenee, H. Ohgaki, O.D. Wiestler, P. Kleihues, D.W. Ellison, The 2016 world organization classification of tumors of the central nervous system: A summary. *Acta Neuropathol* **131**, 803–820 (2016)
19. N. Shinjima, K. Tada, S. Shiraishi, T. Kamiryo, M. Kochi, H. Nakamura, Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer Res* **63**, 6962–6970 (2003)
20. L.J. Layfield, C. Willmore, S. Tripp, C. Jones, R.L. Jensen, Epidermal growth factor receptor gene amplification and protein expression in glioblastoma multiforme. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **14**, 91–96 (2006)
21. TCGA (The Cancer Genome Atlas Research Network), Molecular profiling reveals biologically discrete subsets and pathways of progression in diffuse glioma. *Cell* **164**, 550–563 (2016)
22. C. D'Souza-Schorey, P. Chavrier, ARF proteins: Roles in membrane traffic and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 347–358 (2006)
23. H.J. Sabe, Requirement for Arf6 in cell adhesion, migration, and cancer cell invasion. *Biochemist* **134**, 485–489 (2003)
24. P.L. Boulay, M. Cotton, P. Melançon, A. Claing, ADP-ribosylation factor 1 controls the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway to regulate epidermal growth factor-dependent growth and migration of breast cancer cells. *J Biol Chem* **283**, 36425–36434 (2008)
25. P.L. Boulay, A. Claing, ARF proteins: Molecular switches controlling tumour proliferation and metastasis. *Med Sci* **25**, 783–785 (2009)
26. D. Wolczyk, M. Zaremba-Czogalla, A. Hryniiewicz-Jankowska, R. Tabola, K. Grabowski, A.F. Sikorski, K. Augoff, TNF- α promotes breast cancer cell migration and enhances the concentration of membrane-associated proteases in lipid rafts. *Cell Oncol* **39**, 353–363 (2016)
27. S. Lewis-Saravalli, S. Campbell, A. Claing, ARF1 controls Rac1 signaling to regulate migration of MDA-MB-231 invasive breast cancer cells. *Cell Signal* **25**, 1813–1819 (2013)
28. V. Muralidharan-Chari, H. Hoover, J. Clancy, J. Schweitzer, M.A. Suckow, V. Schroeder, F.J. Castellino, J.S. Schorey, C. D'Souza-Schorey, ADP-ribosylation factor 6 regulates tumorigenic and invasive properties in vivo. *Cancer Res* **69**, 2201–2209 (2009)
29. S. Oka, H. Uramoto, H. Shimokawa, S. Yamada, F. Tanaka, Epidermal growth factor receptor-GEP100-Arf6 axis affects the prognosis of lung adenocarcinoma. *Oncology* **86**, 263–270 (2014)
30. H. Sabe, S. Hashimoto, M. Morishige, E. Ogawa, A. Hashimoto, J.M. Nam, K. Miura, H. Yano, Y. Onodera, The EGFR-GEP100-Arf6-AMAP1 signaling pathway specific to breast cancer invasion and metastasis. *Traffic* **10**, 982–993 (2009)
31. M.M. Tsai, P.Y. Lin, W.L. Cheng, C.Y. Tsai, H.C. Chi, C.Y. Chen, Y.H. Tseng, Y.F. Cheng, C.D. Chen, Y. Liang, C.J. Liao, S.M. Wu, Y.H. Lin, I.H. Chung, C.S. Wang, K.H. Lin, Overexpression of ADP-ribosylation factor 1 in human gastric carcinoma and its clinicopathological significance. *Cancer Sci* **103**, 1136–1144 (2012)
32. C. Münzberg, K. Höhn, D. Krndjia, U. Maaß, D.K. Bartsch, E.P. Slater, F. Oswald, P. Walther, T. Seufferlein, G. von Wichert, IGF-1 drives chromogranin a secretion via activation of Arf1 in human neuroendocrine tumour cells. *J Cell Mol Med* **19**, 948–959 (2015)
33. M. Li, S.S. Ng, J. Wang, L. Lai, S.Y. Leung, M. Franco, Y. Peng, M.L. He, H.F. Kung, M.C. Lin, EFA6A enhances glioma cell invasion through ADP ribosylation factor 6/extracellular signal-regulated kinase signaling. *Cancer Res* **66**, 1583–1590 (2006)
34. B. Hu, B. Shi, M.J. Jarzynka, J.J. Yiin, C. D'Souza-Schorey, S.Y. Cheng, ADP-ribosylation factor 6 regulates glioma cell invasion through the IQ-domain GTPase-activating protein 1-Rac1-mediated pathway. *Cancer Res* **69**, 794–801 (2009)
35. E. Haines, C. Saucier, A. Claing, The adaptor proteins p66Shc and Grb2 regulate the activation of the GTPases ARF1 and ARF6 in invasive breast cancer cells. *J Biol Chem* **289**, 5687–5703 (2014)
36. S. Schlienger, S. Campbell, A. Claing, ARF1 regulates the rho/MLC pathway to control EGF-dependent breast cancer cell invasion. *Mol Biol Cell* **25**, 17–29 (2014)
37. M. Li, J. Wang, S.S. Ng, C.Y. Chan, M.L. He, F. Yu, Y. Peng, M.L. He, H.F. Kung, M.C. Lin, Adenosine diphosphate-ribosylation factor 6 is required for epidermal growth factor-induced glioblastoma cell proliferation. *Cancer* **115**, 4959–4972 (2009)
38. Y.V. Loskutov, P.Y. Kozyulina, V.K. Kozyreva, R.J. Ice, B.C. Jones, T.J. Roston, M.B. Smolkin, A.V. Ivanov, R.B. Wysolmerski, E.N. Pugacheva, NEDD9/Arf6-dependent endocytic trafficking of matrix metalloproteinase 14: A novel mechanism for blocking mesenchymal cell invasion and metastasis of breast cancer. *Oncogene* **34**, 3662–3675 (2015)
39. C. Daumas-Duport, G. Szikla, Definition of limits and 3D configuration of cerebral gliomas. Histological data, therapeutic incidences (author's transl). *Neurochirurgie* **27**, 273–284 (1981)
40. A. Claes, A.J. Idema, P. Wesseling, Diffuse glioma growth: A guerrilla war. *Acta Neuropathol* **114**, 443–458 (2007)
41. M. Monticone, A. Daga, S. Candiani, F. Romeo, V. Mirisola, S. Viaggi, I. Melloni, S. Pedemonte, G. Zona, V. Giaretti, U. Pfeffer, P. Castagnola, Identification of a novel set of genes reflecting different in vivo invasive patterns of human GBM cells. *BMC Cancer* **12**, 358 (2012)
42. P. Ru, T.M. Williams, A. Chakravarti, D. Guo, Tumor metabolism of malignant gliomas. *Cancers (Basel)* **5**, 1469–1484 (2013)
43. O. Keunen, M. Johansson, A. Oudin, M. Sanzey, S.A. Rahim, F. Fack, F. Thorsen, T. Taxt, M. Bartos, R. Jirik, H. Miletic, J. Wang, D. Stieber, L. Stuhr, I. Moen, C.B. Rygh, R. Bjerkvig, S.P. Niclou, Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 3749–3754 (2011)

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 Santonja ², Silvia Calabuig ^{1,4,5} , Lisandra Muñoz-Hidalgo ¹ , Pedro Roldán ⁶, Miguel Cerdá-Nicolás ^{1,3,7} and Concha López-Ginés ^{1,3}

¹ Department of Pathology, University of Valencia, 46010 Valencia, Spain; Lara.navarro@uv.es (L.N.); Javier.megias@uv.es (J.M.); Silvia.calabuig@uv.es (S.C.); lisandramh@gmail.com (L.M.-H.); Jose.m.cerda@uv.es (M.C.-N.); Concha.lopez@uv.es (C.L.-G.)

² Department of Pathology, Hospital General Universitario Valencia, 46014 Valencia, Spain; nuriasantonja3@hotmail.com

³ INCLIVA Foundation, 46010 Valencia, Spain

⁴ Molecular Oncology Laboratory, Fundación para la Investigación Hospital General Valencia, 46014 Valencia, Spain

⁵ Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer, 28029 Madrid, Spain

⁶ Department of Neurosurgery, Hospital Clínico Universitario Valencia, 46010 Valencia, Spain; Pedro.roldan@uv.es

⁷ Department of Pathology, Hospital Clínico Universitario Valencia, 46010 Valencia, Spain

* Correspondence: Teresa.miguel@uv.es; Tel.: +34-963-983-946

† Both first authors have contributed equally to this work.

Received: 5 October 2020; Accepted: 3 November 2020; Published: 6 November 2020



Abstract: Glioblastoma multiforme (GB) is one of the most aggressive tumors. Despite continuous efforts to improve its clinical management, there is still no strategy to avoid a rapid and fatal outcome. *EGFR* amplification is the most characteristic alteration of these tumors. Although effective therapy against it has not yet been found in GB, it may be central to classifying patients. We investigated somatic-copy number alterations (SCNA) by multiplex ligation-dependent probe amplification in a series of 137 GB, together with the detection of *EGFRvIII* and FISH analysis for *EGFR* amplification. Publicly available data from 604 patients were used as a validation cohort. We found statistical associations between *EGFR* amplification and/or *EGFRvIII*, and SCNA in *CDKN2A*, *MSH6*, *MTAP* and *ADD3*. Interestingly, we found that both *EGFRvIII* and losses on *ADD3* were independent markers of bad prognosis ($p = 0.028$ and 0.014 , respectively). Finally, we got an unsupervised hierarchical classification that differentiated three clusters of patients based on their genetic alterations. It offered a landscape of *EGFR* co-alterations that may improve the comprehension of the mechanisms underlying GB aggressiveness. Our findings can help in defining different genetic profiles, which is necessary to develop new and different approaches in the management of our patients.

Keywords: glioblastoma; *IDH*; *ADD3*; *EGFR*; survival; high throughput techniques; precision

1. Introduction

Glioblastoma multiforme, *IDH* wild-type (GB-*IDHwt*), is the most frequent malignant brain tumor in adults and the most aggressive in nature, with an average survival of around 15–18 months [1,2]. GB displays, in addition to morphological heterogeneity, a wide genetic heterogeneity [3,4]. This fact is, despite constant efforts, one of the main causes of the absence of effective treatment and thus,

of the extremely poor prognosis this disease offers [5,6]. The last World Health Organization (WHO) classification tackles GB genetic heterogeneity, putting *IDH* status in the spotlight and associating it to prognosis [1,7]. The mutations that GB-*IDH*wt acquires during clonal evolution do not follow a linear development [4,8]. Many efforts have been made since The Pan Cancer project of TCGA deepened on the high frequency of alterations in the receptor tyrosine kinase/PI3K/PTEN/AKT/mTOR-signaling pathway (present in 88% of GB cases), along with the p53/MDM2/p14ARF molecular pathway (87%) and the CDKN2A/CDK4/6/retinoblastoma signaling pathway (78%) [1,9–12]. Those alterations seem to be a core requirement for GB pathogenesis and they are associated with a poor prognosis [13,14]. Identifying genetic changes in shared nodes of convergence may improve our understanding of diseases [4]. In addition, the identification of differential targets among GB *IDH*-wt genetic subgroups could lead to reach better approaches to GB management. *EGFR* amplification is a hallmark of glioma pathogenesis [4,15,16]. In the last decade, many molecules have shown promising results on pre-clinical or phase 1/2 trials targeting *EGFR*. However, they tend to fail, as recently happened with ABT-414 conjugated with ABBV-321 [16,17]. It is also disappointing that while TKI therapies have been successfully expanded to multiple types of cancer, none of them have improved the lifespan of GB patients [18]. Nevertheless, the interest of assessing *EGFR* copy number status [19–24] along with variants that have been related to cell proliferation, angiogenesis and invasion, and thus, with shortened survival, such as the *EGFR* variant III (*EGFR*vIII) [25–27], is undeniable.

Huge efforts have been made using high-throughput techniques for the genomic analysis of GB [4,28,29]. However, the complexity of the data they provide makes it difficult to draw a targetable GB portrait [1,28]. There is still a long way to progressively introduce objective biomarkers towards precision medicine adapted to the molecular profile of the tumor. High-throughput user-friendly techniques such as multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) could be optimal for the development of new personalized therapies [24,30].

The main goal of this work was to characterize the frequent alteration of *EGFR* via its amplification or the presence of *EGFR*vIII in a series of 137 primary GBs and to assess concomitant somatic copy number alterations (SCNA). We focused on primary, de novo, *IDH*wt GBs, and we delved deeper into the potential use of MLPA to study formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) GB. We aimed to define networks of genetic alterations from a simplified point of view, compared to high-throughput techniques, using such a common kind of material as paraffin embedded tumor tissue samples are. Our results highlight the existence of three groups of tumors according to different complex genetic profiles, where *EGFR* plays a crucial role. We also present the importance of *ADD3* and *EGFR*vIII as genetic biomarkers that may determine a more accurate prognostic for GB patients. Taken together, our results improve the comprehension of the mechanisms underlying GB aggressiveness and establish a new genetic classification that could enhance the clinical management of GB patients.

2. Materials and Methods

2.1. Patients, Samples and Clinical Study

GB samples were obtained from 137 patients surgically treated at the Clinic Hospital of Valencia between 1995 and 2010, with known follow-up. The study was reviewed and approved by Institutional Ethics Committee of the University of Valencia and Clinic Hospital of Valencia. Tumor specimens were fixed in neutral buffered formalin, embedded in paraffin, sectioned, and stained with hematoxylin and eosin (H&E). Samples were categorized according to the WHO classification [1]. Glioblastoma, *IDH*-mutant ($n = 9$), including those that progressed from lower-grade gliomas, were not included in the different statistical analyses. All patients underwent treatment consisting of maximum safe tumor resection and none of them received chemotherapy or radiotherapy before surgery. Similar schemes of first-line treatment, encompassing radiotherapy (50–65 Gray) with concomitant and adjuvant temozolomide-based chemotherapy were applied after surgery in all the cases. A retrospective

survival analysis was performed. Overall survival (OS) was calculated as time from surgery to death. Event times were censored if the patient was alive at the time of last follow-up.

2.2. DNA Extraction, Molecular Analysis of IDH1/2, TP53 and MLPA

Genomic DNA was extracted from FFPE tissue samples using a QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. We analyzed by direct sequencing the genomic regions spanning wild-type R132 of *IDH1* and wild-type R172 of *IDH2*. Exons 5–8 of TP53 were also sequenced. PCRs were performed using standard buffer conditions, 200 ng of DNA and an AmpliTaq Gold Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). PCR products were purified with Centricon columns (Amicon, Beverly, MA, USA) and analyzed on an ABI 310 Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Primer sequences forward (fw) and reverse (rv) were as follow: *IDH1* fw 5'-ACCAAATGGCACCATACGAA and rv 5'-TCACATTATTGCCAACATGACTT, *IDH2* fw 5'-CCAATGGAAGTATCCGGAAC and rv 5'-CCTCTCCACCCTGGCCTAC, TP53 (exon 5) fw 5'-CAGCCCTGTCGTCTCTCCAG and rv 5'-TTCAACTCTGTCTCCTTCT, TP53 (exon 6) fw 5'-GTCTGGCCCCCTCCTC AGCAT and rv 5'-GTCTGGCCCCCTCCTCAGCAT, TP53 (exon 7) fw 5'-CTCAICTGGGCTGTGTGA and rv, 5'-AGTGTGCAGGGTGGCAAGTG, TP53 (exon 8) fw 5'-ACCTGATTCC TACTGCCTCTTGC and rv 5'-GTCCTGCTGCTTACCTC GCTTAGT.

Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) using the MLPA KIT P105 (version C1-C2) and ME024 (version A1-B1) was performed in accordance with the manufacturer's protocol (MRC Holland, Amsterdam, Netherland) [30,31]. Amplification products were separated on an ABI 310 Sequencer (Applied Biosystems, Inc, Foster City, CA, USA) and data analysis was made with Coffalyser excel-based software (MRC-Holland) [32], where relative probe values of probe-amplified products are compared with normal controls. These kits included multiple glioma and cancer related genes that were evaluated depending on their probes based on previous reports [30,31,33,34], as explained below. Both kits are approved for investigational-use only.

2.3. Status of EGFR: EGFRvIII, Copy Number Alterations and Interphase Fluorescence In Situ Hybridization

EGFR was studied by MLPA using the P105 kit (MRC-Holland). It includes 11 probes for exons 1–8, 13, 18 and 24 of *EGFR*. This design allowed us to determine on one hand, the presence of the variant III and on the other hand, somatic copy number alterations (SCNAs) of *EGFR* in the samples analyzed. Following previously published descriptions, to identify *EGFRvIII* we determined the average value for exons 2–7 probes and established the ratio with the average value of probes for exons 1, 8, 13, 18 and 24. Patients with ratios below 0.8 were considered to harbor the *EGFRvIII* [31,35]. SCNAs of *EGFR* were determined based on the average value of exons 1, 8, 13, 18 and 24 in order to exclude the ones that are frequently involved in *EGFR* variants. The thresholds applied classified the samples as no amplified ($0.7 < x < 1.3$) or gained ($x \geq 1.3$) for downstream statistical analysis. We also analyzed the *EGFR* gene status in interphase cells by dual-color FISH probes using interphase Fluorescence in situ hybridization (iFISH). For that purpose, we used tissue microarrays (TMAs) and the probe LSI *EGFR* SpectrumOrange/CEP-7 SpectrumGreen Probe from Vysis (Abbott Laboratories, IL, USA). Hybridizations were performed according to the manufacturer's instructions, and signals were counted in two different regions of 200 non-overlapping nuclei. We calculated the ratio between the average signal count of *EGFR* and the control probe CEP-7 (*EGFR*/CEP7 ratio). *EGFR* was considered to be amplified when the *EGFR*/CEP-7 signal ratio was >2 [36]. Cases were subclassified according to previous descriptions as GBs with high level of amplification (H-amp) when more than 20% of the cells showed more than 20 copies of *EGFR*. GBs with low levels of amplification (L-amp) included cases with 5–20% of cells with 4–12 copies of *EGFR*. Cases without amplification (N-amp) showed two copies of *EGFR*. The exact ratio was not calculated in cases with high amplification levels [19,36]. The aim of this validation study was to determine the concordance rates of these techniques. Concordance between both techniques was assessed by the Cohen's Kappa statistic. It has a range of 0–1.0 and κ

values <0.2 means a poor agreement, $0.21 < \kappa < 0.4$ means a weak agreement, $0.41 < \kappa < 0.6$ means a moderate agreement, $0.61 < \kappa < 0.8$ means a good agreement and $0.81 < \kappa < 1$ means a very good agreement between techniques.

2.4. Analysis of Locus 9p21 and Other Glioma and Cancer-Related Genes

SALSA MLPA P105 and ME024 included a collection of probes to determine *PTEN* status and genes located on 9p21. Many probes in order to characterize *CDKN2A-CDKN2B* (p15INK4B-p14ARF-p16INK4A) were included. These kits also comprised probes for other genes located up and downstream on 9p21.3 (*KLHL9*, *MIR31*, *MLLT3* and *MTAP*) and for genes located near on 9p (*DOCK8* 9p24.3 and *GLDC* on 9p24.1, and *PAX5* on 9p13.2). In addition, a wide collection of probes addressed to many different genes were assayed, including: *DYSF* (2p13), *MSH6* (2p16), *SIX3* (2p21), *SPAST* (2q22.3), *EDAR* (2q12.3), *CTNNB1* (3p22), *ATR* (3q23), *TGFBR2* (3p24), *CFI* (4q25), *WDR36* (5q22.1), *IL4* (5q31), *CDH7* (8q12), *ADD3* (10q25.2), *MEN1* (11q13.1), *SMPD1* (11p15.4), *COL2A1* (12q13.11), *HNF1A* (12q24), *PCCA* (13q32.3), *ING1* (13q34), *ATL1* (14q22.1), *SNRPN-HB2-85* (15q11.2), *SPG11* (15q21.1), *IQGAP1* (15q26.1), *MVP* (16p11.2), *TRAF4* (17q11.2), *ERBB2* (17q12), *NPC1* (18q11.2), *CACNA1A* (19p13.2), *SMARCA4* (19p13.2), *JAG1* (20p12.2), *ADAMTS5* (21q21.3), and *TIMP3* (22q12.3). The variety of loci explored offered a detailed landscape of GB SCNAs.

To categorize MLPA call to SCNA value, we established deletions as $x < 0.7$, normal as $0.7 < x < 1.3$ and gain as $x > 1.3$. When probe values within the different exons of one locus were heterogeneously distributed across some categories such as heterozygous and homozygous deletions, we defined the category in which more than 70% of probe values belonged. For convenience, homozygous and/or heterozygous deletions collectively were referred to as deletion, while amplification and/or gain as gain/amp. Non-canonical SCNAs such as gain/amp in *CDKN2A*, *PTEN* or *TP53* and deletion in *EGFR* or *CDK4* were not considered in the data analysis.

2.5. Statistical Analysis

The statistical analysis of the data was carried out according to the type of variable. Quantitative variables were evaluated using the Kolmogorov-Smirnov and Levene tests; depending on their results and their characteristics, Student's t-test, ANOVA, Mann-Whitney-Wilcoxon test or Kruskal-Wallis test were performed. For comparisons among categorical variables, Fisher's exact, Pearson's chi-squared, and Kruskal-Wallis test were used depending on the number or rows/columns and the expected frequencies. A survival analysis using the Kaplan-Meier method was also done. The statistical significance of these curves was calculated using the log-rank (Mantel-Cox) test. Significance was accepted at least at $p < 0.050$ level. Data were analyzed with SPSS (version 26) software (IBM, Madrid, Spain). To perform the clusters, the average-linkage method was used. Therefore, distance between clusters was obtained as the average distance between all possible pairs of cases from both clusters, providing robust groups. Euclidean distance was used because of the binary scale of the genetic variables. The choice of three clusters was decided from the hierarchical tree, according to the level of heterogeneity at which the clusters were combined. Cluster combination stopped when this level was roughly 70% of the total amount.

2.6. TCGA Analysis and Functional Protein Associations

We accessed data for GB samples from The Cancer Genome Atlas (TCGA) by using cBioPortal for Cancer Genomics (www.cbioportal.org) [12,37,38] to validate whether the SCNAs detected in our cohort were associated with *EGFR* amplification there. We studied the Genomic Profile "Putative copy-number alterations from GISTIC" for the latest dataset available in cBioportal for GB (TCGA, Provisional 604 samples). Copy number alteration data from 577 cases were obtained and further analyzed. A "User-Defined List", including *EGFR*, *CDKN2A*, *MTAP*, *TRAF4*, *JAG1* and *MSH6*, was entered into the "Enter Gene" box. Samples were classified for each gene according to their putative copy number variation calculated by GISTIC with default cBioportal thresholds 33. The groups were

Diploid (0), Shallow Deletion (−1), Deep deletion (−2), Gain (1) and Amplification (2). The associations between EGFR amplification and the copy number profile were analyzed using the “Plots” tool and retrieving the raw data. Outlier values ($n < 10$ from 577 cases) were negligible. Statistical significance for amplification vs. diploid and deletion (shallow or deep) vs. diploid for each gene was assessed using Fisher’s exact test.

We also used the Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING) database of known and predicted protein-protein interactions (<https://string-db.org>) to establish associations among the proteins encoded by the genes affected by SCNAs in this series. This database contains information from numerous sources, including KEGG, Reactome or Pubmed, among others [37]. To make a restrictive analysis, we explored both evidence and confidence meaning of network edges and we increased the minimum required interaction score to ‘high confidence (0.700)’ to reach a greater reliability.

3. Results

3.1. Clinical and Histopathological Data

Our study included 137 patients. Clinical data, including age, sex, tumor location, size, initial symptom and Karnofsky performance status scale (KPS), are summarized in Table 1. Mean age at diagnosis was 57.7 years and male/female ratio was 1.17. OS was 210 days and did not reflect statistical differences depending on sex nor age. Histologically, all tumors showed features of GB with pleomorphic astrocytic tumor cells, prominent microvascular proliferation and necrosis (Figure 1). From confirmed primary GB ($n = 135$), the majority were IDHwt ($n = 128$) but a little subgroup of tumors displayed IDH mutations ($n = 7$) despite being primary GB (GB-IDHmut). In agreement with the WHO 2016 classification, these GB-IDHmut-affected patients were significantly younger (40.9 years in IDHmut vs. 59 years in IDHwt, $p < 0.001$ **). OS was also significantly higher in IDHmut than in IDHwt patients (3300 days vs. 180 days, $p < 0.001$ **). From the 128 cases, 63.9% of patients were >55 years old at diagnosis, the 56.3% were male and 76.9% had a KPS ≤ 85 preoperatively. Interestingly, tumor Pearson correlation test demonstrated an association between tumor size and OS ($p = 0.020$ *).

3.2. EGFR Status Assessment by iFISH and MLPA

iFISH analysis showed a distribution of cases among N-amp, L-amp and H-amp of 35.6%, 12.7% and 51.7%, respectively (Figure 1). Similarly, MLPA analysis, which only separates two categories, showed that 29.7% of cases had no EGFR gains, whereas 70.3% of the cases displayed gain of EGFR copies. Comparing FISH H-amp and L-amp with MLPA “gain”, and FISH N-amp with MLPA “no gain”, concordance between both techniques was good, with a coincident result in 83.05% of the samples (Cohen’s kappa index: 0.610). Agreement was 93.4% for L-amp and H-amp GBs assessed by iFISH that were detected as gains by MLPA. Regarding N-amp tumors, the concordance dropped to 64.3% (Supplementary Table S1 shows the result from both techniques for each case). The visual determination of EGFR made iFISH more suitable to categorizing the cases according to their amplification status. Thus, the following analyses regarding EGFR amplification status were established according to the iFISH data. Among the 128 GB patients, we found no significant associations between EGFR amplification and survival ($p = 0.387$). Clinical data did not reveal any strong association to the amplification status either: 50.8% of men and 49.2% of women displayed H-amp EGFR, reflecting no differences depending on the basis of sex. We did not find significant associations between EGFR amplification and patient age.

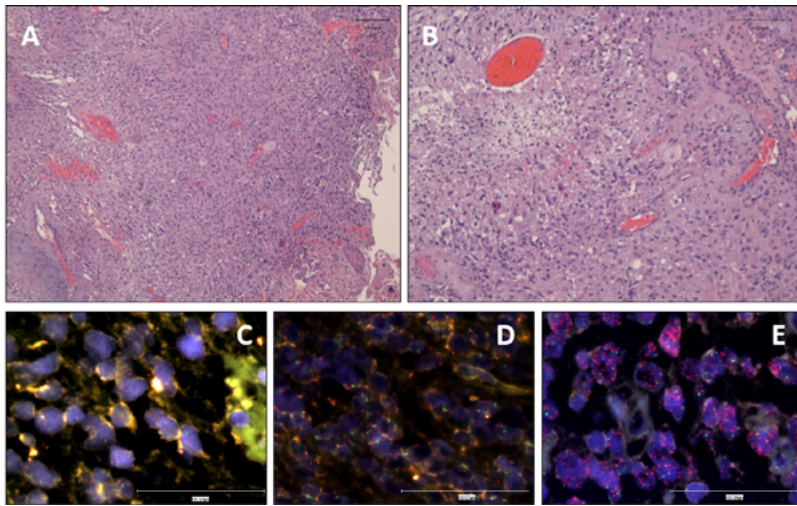


Figure 1. Representative microphotographs of GB, IDH-wt. (A) High cellularity and poor differentiation with prominent microvascular proliferation and necrosis (Hematoxylin and Eosin, 10×). (B) Highly anaplastic, heterogeneous cells and microvascular proliferation (Hematoxylin and Eosin, 20×). (C–E) iFISH microphotographs showing the status of EGFR by an orange LSI-EGFR probe and the centromere of chromosome 7 as a reference, stained by CEP-7 green probe in cases representing the three levels of amplification. (C) No EGFR amplification (40×). (D) Low level of EGFR amplification (40×). (E) High EGFR amplification (40×).

3.3. EGFR Variant III Is More Frequent in Women and Is Associated with Shortened Survival

MLPA allowed us to determine the presence of EGFRvIII. IDHwt GBs (n = 128) exhibited EGFRvIII in 35.2% of the cases (n = 45). Clinical data revealed no differences between both groups regarding age, tumor location nor size. Nevertheless, there was a significant increase in the presence of this variant in women (55.6% EGFRvIII vs. 37.3% EGFRwt, $p = 0.047^*$). Interestingly, Kaplan–Meier analysis revealed statistical differences in OS (Figure 2, $p = 0.014^*$), accounting 150 days in EGFRwt vs. 90 days in EGFRvIII (Student t -test $p = 0.027^*$). In addition, EGFRvIII was significantly more frequent in GBs with EGFR amplification. We found it in 10 cases of N-amp GBs (23.8%), 2 cases of L-amp GBs (13.3%) and 31 cases of H-amp GBs (50.8%, $p = 0.003^{**}$).

Table 1. Clinical data and baseline molecular characteristics of 137 glioblastoma patients.

Parameter	Specification	Outcome	Wild-Type IDH1/2 (n = 128)	Mutated IDH1 (n = 9)	p-Value
Age	Mean (range), in years	57.7 (24–81)	59 (24–81)	40.9 (32–52)	*** <0.001 ^{mw}
	≤55	40.6%	36.1%	100%	*** <0.001 ^{x²}
	>55	59.4%	63.9%		
Sex	Male	54.0%	56.3%	22.2%	0.080 ^{ft}
	Female	46.0%	43.7%	77.8%	
Tumor location	Parietal	35.0%	33.9%	50.0%	0.282 ^{kw}
	Frontal	20.3%	19.1%	37.5%	
	Temporal	36.6%	38.3%	12.5%	
	Occipital	4.9%	5.2%		
	Intraventricular	0.8%	0.9%		
	Corpus Callosum	2.4%	2.6%		

Table 1. Cont.

Parameter	Specification	Outcome	Wild-Type IDH1/2 (n = 128)	Mutated IDH1 (n = 9)	p-Value	
Size (cm ³)	Mean (range)	5.2 cm (2–11)	5.1 cm (2–11)	6.0 cm (5–7)	0.210 ^{mw}	
	Neurological deficit	30.0%	32.1%	0%		
Initial symptom	Epileptic seizure	21.7%	21.4%	25.0%	0.146 ^{kw}	
	Intracranial hypertension	48.3%	46.5%	75.0%		
	≤85	76.9%	77.0%	75.0%		
KPS	>85	23.1%	23.0%	25.0%	1.000 ^{ft}	
	Median (95 CI)	210 days	180 days	3300 days	*** <0.001 ^{lr}	
Overall survival	TP53	Mutation	20.2%	17.3%	50.0%	* 0.028 ^{x²}
	Alteration	61.4%	64.4%	22.2%	* 0.012 ^{x²}	
EGFR FISH	N-amp	38.6%	35.6%	77.8%	* 0.011 ^{x²}	
	L-amp	13.4%	12.7%	22.2%		
	H-amp	48.0%	51.7%	0.0%		
	No	65.9%				
EGFRvIII	Yes	34.1%				
	EGFR	Gain	65.4%	70.1%	0.0%	*** <0.001 ^{x²}
Normal		34.6%	29.9%	100%	*** <0.001 ^{kw}	
SCNA	CDKN2A	Alteration	63.5%	65.6%	33.3%	0.052 ^{x²}
		Loss	53.3%			
	CDKN2B	Gain	10.2%			
		Alteration	54.0%	56.3%	22.2%	
	PTEN	Loss	48.9%			0.080 ^{ft}
		Gain	5.1%			
	MTAP	Alteration	65.9%	65.9%	66.7%	0.961 ^{x²}
		Loss	55.6%			
	TIMP3	Gain	10.4%			
		Alteration	52.9%	53.5%	44.4%	0.734 ^{ft}
ERBB2	Alteration	65.0%	64.1%	77.8%	0.404 ^{x²}	
	Alteration	26.5%				
MVP	Alteration	59.5%	56.3%	100%	* 0.020 ^{ft}	
	Alteration	60.6%	57.8%	100%	* 0.012 ^{x²}	
ADD3	Alteration	45.3%	46.9%	22.2%	0.183 ^{ft}	
	Alteration	44.1%	46.6%	12.5%	0.075 ^{ft}	

Prevalence of genetic alterations and cross tabulation of IDH1 mutation status versus clinical characteristics and genetic alterations are depicted. For genetic alteration, only significant findings are shown (* means $0.05 > p > 0.01$, ** means $0.01 > p > 0.001$, *** means $p < 0.001$). Data are mean (range), number (%), or median (95%CI). Abbreviations: CNA, copy number alteration; ft, Fisher's exact test; KFS, Karnofsky Performance Status; kw, Kruskal–Wallis test; lr, long-rank test; mw, Mann–Whitney–Wilcoxon test and χ^2 , Pearson's chi-squared test.

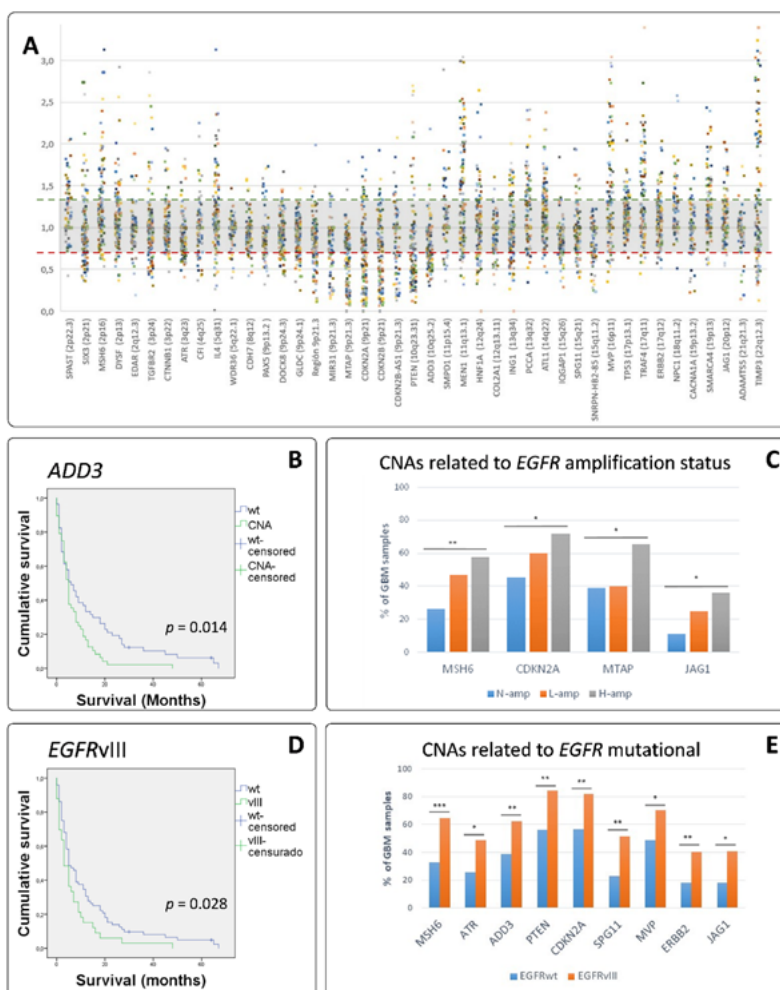


Figure 2. GB somatic copy number alterations (SCNA). (A) Distribution of MLPA calls from each case on the targeted genes assayed showing the heterogeneity of GB. (B) Association between *ADD3* SCNA and overall survival (OS). The Y-axis represents the cumulative survival time in terms of probability: it oscillates between 0 (0% of cases) and 1 (100% of cases). The X-axis shows the survival period, expressed in months. The blue line represents survival on patients with wild-type *ADD3* (mean = 13.46 months). The green line represents survival in patients which tumors showed SCNA on *ADD3* (mean = 6.98 months). Long Rank (Mantel–Cox) analysis demonstrate statistical significance. (C) Concomitant SCNA with the *EGFR* amplification status. *MSH6* $p = 0.007$, *CDKN2A* $p = 0.023$, *MTAP* $p = 0.017$ and *JAG1* $p = 0.029$. (D) Association between *EGFRvIII* and OS. The blue line represents survival on patients with *EGFRwt* (mean= 180 days). The green line represents survival in patients which tumors showed *EGFRvIII* (mean= 150 days). Long Rank (Mantel–Cox) analysis demonstrate statistical significance. (E) Concomitant SCNA with the presence of *EGFRvIII*. *MSH6* $p = 0.001$, *ATR* $p = 0.019$, *ADD3* $p = 0.010$, *PTEN* $p = 0.002$, *CDKN2A* $p = 0.004$, *SPG11* $p = 0.003$, *MVP* $p = 0.032$, *ERBB2* $p = 0.008$, and *JAG1* $p = 0.013$. * was used for $0.050 > p > 0.010$, ** for $0.010 > p > 0.001$ and *** for $p \leq 0.001$.

3.4. MLPA Analysis Showed a Great Heterogeneity in GB

We identified that 100% of the tumor cases showed SCNA in at least two of the genes analyzed. In addition, from all the loci explored, we found SCNA in all of them in at least seven cases. An overview of the prevalence of genetic alterations identified in 128 GB-IDHwt patients is shown in Table 1. A summary of all the SCNAs detected among the studied genes can be seen in Figure 2A which offers a landscape of the high genetic heterogeneity found. We detected alterations affecting more than 45% of the cases on EGFR (70.1% of the cases), CDKN2A (65.6%), TIMP3 (64.1%), MEN1 (57.8%), CDKN2B (56.3%), MVP (56.3%), PTEN (54.8%), MTAP (53.5%), ADD3 (46.9%) and PCCA (46.6%). From those loci, only ADD3 tend to be more altered in women (55.4% of the cases) than in men (40.3% of the cases). However, ADD3 demonstrated to be associated with OS, as patients with SCNAs on ADD3 showed an OS of 6.98 ± 1.17 months while patients with no-SCNA on ADD3 showed an OS of 13.46 ± 2.24 months ($p = 0.012$ *). Long Rank (Mantel–Cox) analysis demonstrate a statistic association ($p = 0.014$ *, Figure 2B).

3.5. EGFR Amplified GBs Displayed Different SCNAs to Non-EGFR Amplified Cases

In this series, four genes revealed statistical differences on their affectation, depending on the amplification status of EGFR: losses/gains of MSH6 on 2p16.3, losses of CDKN2A and MTAP, both on 9p21 and gains of JAG1 on 20p12.2 (Figure 2C). TCGA analysis through cBioportal supported our data, as it showed strong associations between both CDKN2A and MTAP losses and EGFR gain/amp ($p < 0.0001$ ***). Of note is that both genes are located in 9p21. TCGA data also showed statistical association between JAG1 gain/amp and EGFR gain/amp ($p < 0.0001$ ***). MSH6 showed alterations in a little number of GBs and did not reach a significant result (Table 2). STRING analysis provided a PPI enrichment p -value of 0.000987 and association to NOTCH3 activation and to a negative regulation of cell–matrix adhesion. Based on previous reports [7], we looked for GB with triple SCNA (EGFR, CDKN2A and PTEN); in our series, this appeared in 25.0% of the cases and they showed an OS of 7.64 ± 1.97 months, which was lower than the 11.25 ± 1.71 months in cases with no triple SCNA.

Looking for differences depending on EGFR status, we found in our series that EGFRvIII cases displayed statistically different SCNAs than their EGFRwt counterparts: MSH6 (2p16.3), ATR (3q23), ADD3 (10q25.1), PTEN (10q23.31), CDKN2A (9p21), SPG11 (15q21), MVP (16p11.2), ERBB2 (17q12), JAG1 (20p12.2) (Figure 2E). STRING functional analysis of these genes revealed a PPI enrichment p -value of 9.2×10^{-6} and a non-random association with negative regulation of cell–matrix adhesion processes (false discovery rate –FDR- of 0.00100).

Table 2. Data from TCGA analysis performed using cBioportal.

		EGFR			
		Shallow Deletion	Diploid	Gain	Amplification
CDKN2A	Deep deletion	2	20	131	178
	Shallow deletion	3	19	48	38
	Diploid	1	22	61	35
	Gain	0	2	14	3
	Amplification	0	1	0	0
*** n = 577; $p < 0.00001$; Chi-square 461.258					
JAG1	Shallow deletion	1	3	13	1
	Diploid	3	52	153	126
	Gain	2	9	88	125
	Amplification	0	0	0	1
*** n = 576; $p < 0.00001$; Chi-square 41.9092					

Table 2. Cont.

		EGFR			
		Shallow Deletion	Diploid	Gain	Amplification
MSH6	Shallow deletion	0	8	15	14
	Diploid	4	55	220	225
	Gain	2	1	19	14
n = 571; $p > 0.05$; Chi-square 7.2998					
MTAP	Deep deletion	2	18	114	169
	Shallow deletion	3	21	61	46
	Diploid	1	22	65	35
	Gain	0	2	14	3
	Amplification	0	1	0	0
*** n = 570; $p < 0.00001$; Chi-square 46.413					

Annotated CNAs depending on EGFR amplification status. * was used for $0.050 > p > 0.010$, ** for $0.010 > p > 0.001$ and *** for $p \leq 0.001$.

3.6. Clustering Analysis Revealed Different Genetic Glioblastoma Groups

Hierarchical cluster classification distinguished three groups (C1, C2 and C3) depending on the frequencies of alteration within the different loci explored (Table 3). In this analysis we excluded 37 patients because some markers were not available. From the 91 patients to classify, 18 were unclassifiable subjects due to the diversity of the SCNAs found and 73 were distributed among the three different groups performed. The clusters showed partially overlapped changes and others completely differentiated among them (Figure 3). The Chi-squared test was used to assess the dependence between the normal/alterted presence of a gene and the membership cluster in order to identify which genes have a higher power of discrimination. When the expected frequency in cells of the cross-table was too small ($n < 5$) in more than 33% of cells, the Kruskal–Wallis test was used as an alternative to Chi-squared. Regarding clinical data, size was similar in the different clusters, showing an average of 5.7 cm in C1, and 5.3 cm in C2 and 4.9 in C3. Age at diagnosis also showed similar averages (59, 57 and 61 years, respectively). Overall survival was 7.2 months for C1, 5.9 for C2 and 10.7 months for C3. Genetically, the analysis showed that C1 was the least affected, C2 showed alterations of near half of the loci explored in more than 50% of the cases, and C3, displayed an intermediate situation, with near 30% of the genes included affected in more than 50% of the cases. When we analyzed the EGFR amplification status by iFISH in relation to these clusters, we found statistically significant differences ($p = 0.007$ **): most cases from C1 were N-amp (63.0%), compared to 28.0% and 19.0% in C2 and C3, respectively. Most cases from C2 and C3 where H-amp (64.0% and 61.9%, respectively), compared to 22.2% in C1. This distribution of the cases for the L-amp group was more homogeneous, accounting 14.8%, 8.0% and 19.0% in C1, C2 and C3, respectively.

Table 3. Clustering analysis of GBM IDHwt.

Genes Studied	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	<i>p</i> -Value
<i>CTNNB1</i>	11.1	8.0	28.6	0.120 (KW)
<i>CDH7</i>	0.0	12.0	4.8	0.166 (KW)
<i>IQGAP1</i>	18.5	12.0	23.8	0.581 (KW)
<i>GLDC</i>	7.4	12.0	23.8	0.254 (KW)
<i>TP53</i>	11.1	12.0	42.9	0.011 * (Chi)
<i>TGFBR2</i>	11.1	16.0	9.5	0.781 (KW)
<i>ING1</i>	18.5	24.0	33.3	0.495 (Chi)
<i>SIX3</i>	14.8	24.0	52.4	0.014 * (Chi)
<i>IL4</i>	14.8	24.0	66.7	<0.001 *** (Chi)
<i>PCCA</i>	44.4	24.0	85.7	<0.001 *** (Chi)
<i>DYSF</i>	18.5	28.0	42.9	0.180 (Chi)
<i>HNF1A</i>	37.0	28.0	57.1	0.124 (Chi)
<i>DOCK8</i>	7.4	32.0	9.5	0.036 * (KW)
<i>ERBB2</i>	14.8	36.0	19.0	0.169 (Chi)
<i>ATL1</i>	22.2	36.0	52.4	0.096 (Chi)
<i>ATR</i>	25.9	48.0	19.0	0.080 (Chi)
<i>TRAF4</i>	44.4	52.0	28.6	0.268 (Chi)
<i>JAG1</i>	3.7	56.0	9.5	<0.001 *** (Chi)
<i>SPG11</i>	14.8	56.0	9.5	<0.001 *** (Chi)
<i>EGFRvIII</i>	14.8	56.0	23.8	<0.001 *** (Chi)
<i>MSH6</i>	11.1	60.0	66.7	<0.001 *** (Chi)
<i>ADD3</i>	40.7	72.0	42.9	0.048 * (Chi)
<i>SMARCA4</i>	33.3	84.0	4.8	<0.001 *** (Chi)
<i>MVP</i>	51.9	84.0	14.3	<0.001 *** (Chi)
<i>MTAP</i>	22.2	84.0	76.2	<0.001 *** (Chi)
<i>PTEN</i>	44.4	88.0	38.1	<0.001 *** (Chi)
<i>TIMP3</i>	44.4	92.0	57.1	0.001 ** (Chi)
<i>EGFR</i>	40.7	92.0	85.7	<0.001 *** (Chi)
<i>MEN1</i>	44.4	96.0	23.8	<0.001 *** (Chi)
<i>CDKN2A</i>	7.4	100.0	100.0	<0.001 *** (Chi)

p-values were calculated by the (Chi), Pearson's chi-squared test χ^2 and (KW), Kruskal–Wallis test. To highlight statistical significance * was used for $0.050 > p > 0.010$, ** for $0.010 > p > 0.001$ and *** for $p \leq 0.001$.

3.7. Genetic Changes According to Clustering Analysis Point to Differentially Altered Pathways

EGFRvIII and losses in ADD3, associated with survival, were concentrated in cluster 2. In concordance, C2 displayed as aforementioned, the shortest OS. In addition, it showed the highest frequency of SCNAs in CDKN2A, MEN1, EGFR, TIMP3, PTEN, MTAP, MVP, SMARCA4, ADD3, MSH6, JAG1, SPG11 and DOCK8. The gene function and pathway annotation analysis by the STRING software showed a PPI enrichment *p*-value of 0.000522 and an association to the biological processes 'regulation of cell-substrate adhesion' (FDR = 8.36×10^{-5} , by JAG1, CDKN2A, PTEN and MEN1) and 'cell–matrix adhesion' (FDR = 0.000522, by JAG1, CDKN2A and PTEN). Moreover, the Cellular Component analysis showed a significant association to the presence of the proteins encoded in

different parts of the cell. They were detected both in the plasma membrane region (count in gene set: 5/1061), in organelle lumen (count in gene set: 10/5162) and in the nuclear part (count in gene set: 9/4359), all with FDR = 0.0364, suggesting an intense trafficking of these proteins through the cell (Figure 4).

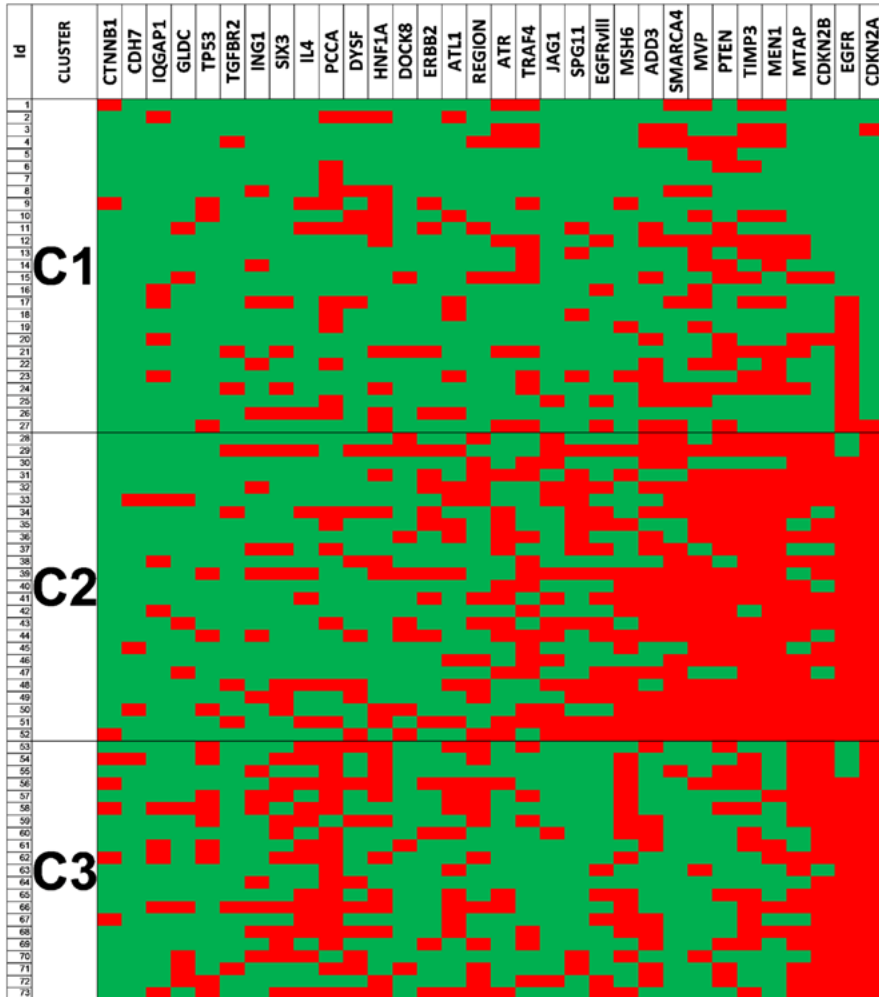


Figure 3. Clustering analysis. Heatmap from the hierarchical cluster classification. The patients included are represented on the Y-axis and the genes that contributed to the model on the X. Green squares show no SCNA, red squares show SCNA. C1, C2 and C3 are shown separately, and the distribution of SCNAs among offers a landscape where C1 is the one with less genetic alterations while C2 is the most affected one.

Cluster 3, in common with C2, showed losses in CDKN2A in 100% of the cases, a high frequency of EGFR amplification and SCNA in MTAP and MSH6. Additionally, this C3 displayed frequent SCNAs in TP53, IL4, PCCA and SIX3. STRING analysis showed a PPI enrichment *p*-value of 0.0019 and an association to the biological processes ‘regulation of cell cycle phase transition’ with an FDR of 0.0060. However, no specific cellular component was revealed. Finally, C1 was the less altered cluster.

It showed a statistically significant lower level of CDKN2A, MSH6, MTAP and EGFR alterations compared with its counterparts.

Overall, GB-IDHwt displayed a wide genetic heterogeneity. However, cluster analysis allowed a separation based on the frequency of alterations detected by MLPA into three groups. From them, the two that displayed EGFR amplification offered completely different outcomes, depending on the presence of additional alterations, as SCNA on ADD3 and the variant III of EGFR. These two changes were shown to be independent biomarkers for bad prognosis, and their statistical association to C2 highlights the interest of exploring the aggregation of genetic alterations in it.

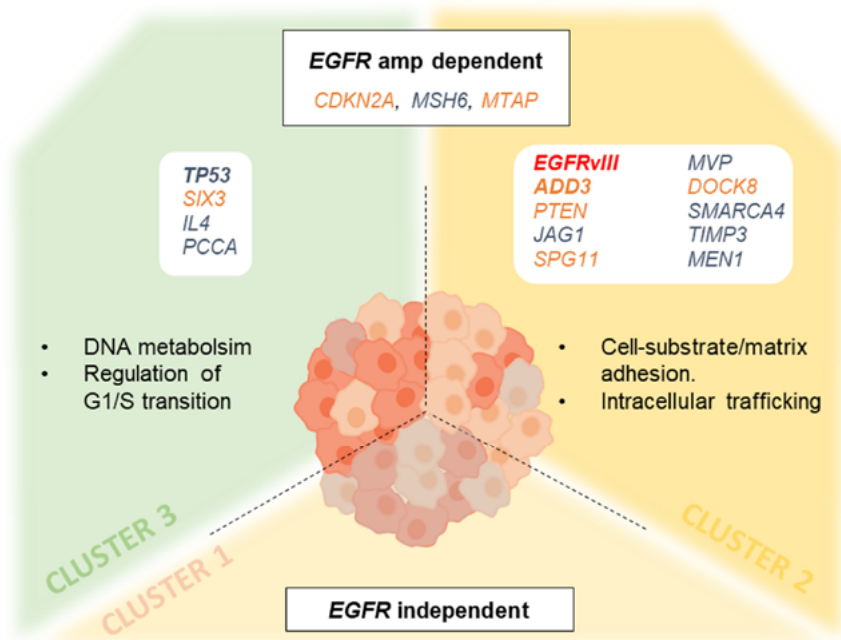


Figure 4. Pathways outlined by clustering analysis. The introduction of genes that differentially contributed to the clusters on the STRING database analysis platform offered a variety of genetic pathways and processes that were especially damaged in C2 and C3. Genes in blue displayed gains, genes in orange displayed losses, *EGFRvIII* includes loss from exons 2–7. Genes in bold were the most distinctive among the clusters. It needs to be mentioned that MSH6, in addition to gains, showed losses in <10% of the cases. The main difference between C2/C3 and C1 is that on C1, *EGFR* alterations were found only in half of the cases. Despite C2 and C3 share some alterations, the downstream connections lead to a subtly quicker disease on C2 compared to the slowest situation on C3.

4. Discussion

EGFR genetic alteration is an essential component of the portrait of most GBs occurring in 57% of tumors [4,38]. This frequency is similar to what we find for *EGFR* amplification and *EGFR* mutation in this work. This fact, along with the devastating outcome of GB, justifies the continuous search for associations in relation to *EGFR* changes and the therapeutic responses of patients. In light of the TCGA project, RTK alterations and their downstream effectors are of potential interest as targetable driver mutations [39]. However, it could be especially interesting to be able to classify our patients depending on specific common changes or even better, different pathways affected, to understand what makes them undergo a quicker or slower disease.

The use of iFISH to precisely determine the *EGFR* amplification status is the current gold-standard in GB [19,40]. Previous works of our and others groups, demonstrated that this method allows the detection of intermediate levels of amplification [19,24]. Lassman and his colleagues deepened the potential of different new techniques in comparison to iFISH with positive results [40]. In the present work, we compared the potential of MLPA to that aim because it is a user-friendly and cost-effective technique, and the Cohen agreement we got was also good. The point of iFISH remains the possibility of separating that intermediately amplified group, for which it is not entirely clear whether it represents a progression via the amplification status or a separate path for tumor progression in GB. In any case, MLPA proves to be an easy and fast technique, with the additional advantage of being able to determine mutant variants such it is *EGFRvIII*, in agreement with previous works [21,24,31,35].

The wide heterogeneity of cancer cells is a common challenge in terms of learning how to stop tumor growth. The clonal evolution of GB *IDHwt* and the acquisition of new mutations represent a major problem for finding effective therapies [1,4,8,23]. This heterogeneity is patent in our work; from all the loci explored, we found SCNA in all of them in at least one case. The genetics of H-amp GB and GB displaying *EGFRvIII* offers landscapes that are statistically different from their N-amp/L-amp or *EGFRwt* counterparts, respectively. STRING analysis correlates the SCNA statistically associated with amplified-*EGFR* GBs with *NOTCH3* activation and negative regulation of cell–matrix adhesion. Crespo et al., using high-density (500K) single-nucleotide polymorphism arrays, achieved similar relevance for the axis established with *MTAP* [16]. In concordance with that work, our group of patients that displayed *EGFRvIII*, which is the one with the worst outcome, also showed the impairment of cell–matrix adhesion processes. Despite the alteration of different sets of genes, we found a higher frequency of *EGFRvIII* among the *EGFR* amplified GBs, in concordance with previous works [9,24], and interestingly, we found a significant association between *EGFRvIII* and a shortening in survival, supporting previous descriptions [22,27,41].

An outstanding finding when analyzing the genes whose alterations were associated with *EGFRvIII* is that *ADD3* SCNAs is associated with bad prognosis, with a marked reduction in OS. *ADD3* codifies the γ -adducin, which build heterotetramers with its counterparts α - and β -adducin, and has been widely studied in red-cell membranes [42]. Different works put a spotlight on adducin's controversial role as either oncogene or tumor suppressor in cancer [42–45]. Our findings support a recent report of Kiang KM et al. that points to the downregulation of *ADD3* in GB, but not in less malignant gliomas, as a critical event during malignant progression [46]. While most cell-based studies suggest an oncogenic behavior, different papers on glioma tumor specimens, in agreement with our data, relate *ADD3* downregulation to progression [43,44] and to migration [45]. Other cancer that shows *EGFR* amplification, such as non-small cell lung cancer, shares this *ADD3* infraexpression associated with cell migration [47]. We suggest that the use of such easy techniques as MLPA to assess *ADD3* SCNA could be considered for diagnostic routines to better tailor clinical decisions as an independent prognostic factor and to delve deeper into the GB classification of patients.

The frequency of *ADD3* SCNAs and its co-occurrence with *EGFRvIII* led us to look for genetic clustering. Thus, according to the genetic probes analyzed by MLPA, clustering analysis causes GBs to separate into three different groups. The first cluster (C1) offers a low rate of SCNAs compared with the rest. Cluster 2 (C2) and cluster 3 (C3) share a high rate of SCNAs in *MTAP*, *CDKN2A*, *MSH6* and *EGFR*, in agreement with previous descriptions [16], and suggesting that GBs from both clusters display alterations in DNA metabolic processes (by STRING). However, the second cluster (C2) concentrates the co-existence of *EGFR* alterations through *EGFRvIII* or *EGFR* amplification and the highest rate of SCNAs. Of these, it is worth mentioning that *JAG1*, which is involved in angiogenesis [48], *MVP*, was recently implicated in vesicle trafficking [21] or the aforementioned *ADD3*. Coherent with these data, this cluster displayed the shortest OS. It is curious that *MSH6*, in addition to showing gains as was previously reported in association with resistance to chemotherapy [49], displays losses in a short set of cases in this series. These cases with losses do not show an increase on the tumor genetic burden consequence of the defect on DNA repair, but interestingly, they show a really subtle increase in

survival. It is not significant, but it deserves to be further studied, as it resembles the protective effect of the promoter methylation of *MGMT*, which improves responsiveness to temozolomide treatment [1,50]. Regarding *MTAP*, its deficiency is usually seen as a collateral effect of *CDKN2A* deletion, because of its location next to this gene [51,52]. Nevertheless, it is necessary to improve our understanding of the consequences of this loss because it could offer different insights into therapy. It is known that the loss of *MTAP* influences the metabolism of ATP: both adenine and adenosine are disturbed as a consequence of the disruption of the polyamine salvage pathway [53,54]. This fact could be related to the metabolic reprogramming strategy to actively modulate the immune landscape of GB [55]. Contrary to what was expected, it was shown that adenosine did not significantly accumulate in GB [55]. This fact would be in line with previous descriptions of N6-isopentenyladenosine and other modified nucleosides, with important anti-proliferative and pro-apoptotic effects in GB cases that display amplification on *EGFR* [56,57]. Interestingly, in our study, cluster 2 and 3 showed amplifications on *EGFR* and losses on *CDKN2A* in all cases, along with a high proportion of cases displaying *MTAP* losses. It would be desirable to further study whether the efficacy of those molecules could represent a therapeutic benefit for these specific patients with adenosine metabolism disturbances.

A noteworthy fact is that *ADD3* and *EGFRvIII*, both previously reported as alterations associated with shortened survival in GB [27,46] and confirmed here, are a signature in this C2. On the other hand, C3 involves *TP53* alterations in addition to the shared ones. This fact completely makes sense considering that *TP53* mutations are, according to the WHO, more frequent in the group of GB with *IDH* mutations, characterized by a higher survival than *IDHwt* GBs [1]. Moreover, *EGFRvIII* has been broadly associated with a poorer outcome [22,27]. These findings reflect that, not only the amplification status of *EGFR* could be decisive in the comprehension of GB progression, but also the interconnection established with parallel genetic pathways.

A comparison between the main findings in the clusters defined here and the previously reported TCGA expression subtypes [10,38] is worthy of some comments: the small set of GB, *IDH*-mutant cases we studied may fit in the proneural TCGA group, with mutations in *TP53* in half of the samples and loss of *PTEN* in 2/3 of the cases. Similarly, lifespan is higher, as we expected for being *IDH1*-mutant [1]. Cluster 2 fits quite well in the “Classical” subtype [10,38]. *EGFR* amplification is the main characteristic accompanied by losses on *CDKN2A* in all the cases and losses on *PTEN* in a high proportion (88%). However, cluster 3 seems to be a variant of this classical subtype. It is also characterized by *EGFR* amplification and losses on *CDKN2A*, but losses on *PTEN* drop down to a half. However, other alterations define it better than *PTEN* status, such as gains on *TP53* or losses on *SIX3*. It is worth mentioning that *TP53* stands out, but it does so because of SCNA, and not mutations, as would be more characteristic of the mesenchymal TCGA subtype [10,38]. Thus, between these two clusters, a better genetic definition of the patients is offered. It is of note that C1 seems to have little to do with *EGFR*, in contrast to C2 and C3. C1 agrees with the mesenchymal subtype, being the only set of patients that are not characterized by *EGFR* amplification. It displays a complex mix of genetic changes without dominance of any specific feature, all them in lower proportions than its counterparts cluster 2 and 3, and in a similar way as happens in the mesenchymal TCGA subtype [10,38]. On both sides, *EGFR* status-dependent subgroups of GBs, genetically and clinically different, can be separated. The identification of alterations in shared nodes of convergence downstream of RTKs has been an interesting approach in cancer [4,8,58].

The present work sets out MLPA as an advantageous methodology, simple and useful for FFPE specimens. In addition, it may provide new insights into the molecular underpinnings of GB pathogenesis in a comprehensive manner. Clustering the genetic alterations of GB highlights the importance of *EGFR* in this very aggressive tumor type and could represent a strong step towards precision medicine: the aggregation of changes depending on the presence of the amplification of *EGFR*, the mutation variant III or both simultaneously, lead to different pathways to analyze. Our results underline the importance of *EGFRvIII* and *ADD3* SCNAs as markers of poor prognosis that need further consideration in GB. The presence of a group of GB-*IDHwt* without alterations in *EGFR* may

explain part of the absence of effect of RTK inhibitors in this type of tumor. Furthermore, the clear separation of *EGFR*-amplified related GBs, showing sets of genes that are differentially altered, points to the need to rethink the possibilities of personalized therapy in future clinical settings. The differential groups that can be established could be used for a more accurate therapy.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2073-4409/9/11/2429/s1>, Table S1: Amplification status of *EGFR* determined by interphase Fluorescence in situ hybridization and MLPA analysis.

Author Contributions: Conceptualization, T.S.-M., S.C., P.R., M.C.-N. and C.L.-G.; data curation, L.N., T.S.-M., J.M., L.M.-H. and C.L.-G.; formal analysis, L.N., T.S.-M., J.M. and L.M.-H.; funding, T.S.-M. and M.C.-N.; investigation, L.N., N.S. and J.M.; methodology L.N., T.S.-M., N.S., L.M.-H. and C.L.-G.; project administration, T.S.-M., M.C.-N. and C.L.-G.; resources, J.M., P.R. and M.C.-N.; software, L.N., T.S.-M., J.M. and N.S.; supervision, J.M., P.R., M.C.-N. and C.L.-G.; validation, T.S.-M., S.C., M.C.-N. and C.L.-G.; visualization, L.N. and N.S.; writing—original draft L.N. and T.S.-M.; writing—review & editing, L.N., T.S.-M., J.M., N.S., S.C., M.C.-N. and C.L.-G. All the authors have approved the submitted version, they have agreed both to be personally accountable for their own contributions and to ensure that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work, even ones in which they were not personally involved, were appropriately investigated, resolved, and the resolution documented in the literature. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Ministerio de Economía y Competitividad-Instituto de Salud Carlos III, grant number “P114/01669” and by Conselleria d’Educació, Investigació, Cultura i Esport from Generalitat Valenciana grant number “PROMETEO/2011/83” and grant number “GV/2020/048”. The APC was funded by the University of Valencia and the Generalitat Valenciana.

Acknowledgments: The authors want to thank ISCIII-Ministerio de Economía y Competitividad and the Conselleria d’Educació, Investigació, Cultura i Esport from Generalitat Valenciana for the funds received. Thanks to A.M. Clari, R. Gil-Benso and to R. Navarro-Lucas for their continuous support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

- Louis, D.N.; Perry, A.; Reifenberger, G.; von Deimling, A.; Figarella-Branger, D.; Cavenee, W.K.; Ohgaki, H.; Wiestler, O.D.; Kleihues, P.; Ellison, D.W. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A summary. *Acta Neuropathol.* **2016**, *131*, 803–820. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ostrom, Q.T.; Gittleman, H.; Liao, P.; Vecchione-Koval, T.; Wolinsky, Y.; Kruchko, C.; Barnholtz-Sloan, J.S. CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010–2014. *Neuro Oncol.* **2017**, *19*, v1–v88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Lawrence, M.S.; Stojanov, P.; Mermel, C.H.; Robinson, J.T.; Garraway, L.A.; Golub, T.R.; Meyerson, M.; Gabriel, S.B.; Lander, E.S.; Getz, G. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature* **2014**, *505*, 495–501. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Furnari, F.B.; Cloughesy, T.F.; Cavenee, W.K.; Mischel, P.S. Heterogeneity of epidermal growth factor receptor signalling networks in glioblastoma. *Nat. Rev. Cancer* **2015**, *15*, 302–310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Karsy, M.; Gelbman, M.; Shah, P.; Balumbu, O.; Moy, F.; Arslan, E. Established and emerging variants of glioblastoma multiforme: Review of morphological and molecular features. *Folia Neuropathol.* **2012**, *50*, 301–321. [[CrossRef](#)]
- Lu, J.; Cowperthwaite, M.C.; Burnett, M.G.; Shpak, M. Molecular predictors of long-term survival in glioblastoma multiforme patients. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0154313. [[CrossRef](#)]
- Umehara, T.; Arita, H.; Yoshioka, E.; Shofuda, T.; Kanematsu, D.; Kinoshita, M.; Kodama, Y.; Mano, M.; Kagawa, N.; Fujimoto, Y.; et al. Distribution differences in prognostic copy number alteration profiles in IDH-wild-type glioblastoma cause survival discrepancies across cohorts. *Acta Neuropathol. Commun.* **2019**, *7*, 99. [[CrossRef](#)]
- Gerlinger, M.; Rowan, A.J.; Horswell, S.; Math, M.; Larkin, J.; Endesfelder, D.; Gronroos, E.; Martinez, P.; Matthews, N.; Stewart, A.; et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N. Engl. J. Med.* **2012**, *366*, 883–892. [[CrossRef](#)]

9. Hochberg, F.H.; Atai, N.A.; Gonda, D.; Hughes, M.S.; Mawejje, B.; Balaj, L.; Carter, R.S. Glioma diagnostics and biomarkers: An ongoing challenge in the field of medicine and science. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2014**, *14*, 439–452. [[CrossRef](#)]
10. Verhaak, R.G.W.; Hoadley, K.A.; Purdom, E.; Wang, V.; Qi, Y.; Wilkerson, M.D.; Miller, C.R.; Ding, L.; Golub, T.; Mesirov, J.P.; et al. An integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR and NF1. *Cancer Cell* **2010**, *17*, 98. [[CrossRef](#)]
11. Ohgaki, H.; Kleihues, P. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Sci.* **2009**, *100*, 2235–2241. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Cancer Genome Atlas Research Network. The Cancer Genome Atlas Research Network Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* **2008**, *455*, 1061–1068. [[CrossRef](#)]
13. Huse, J.T. Elucidating the oncogenic role of ATRX deficiency in glioma. *Neuro Oncol.* **2014**, *16*, iii45. [[CrossRef](#)]
14. Ohgaki, H.; Kleihues, P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am. J. Pathol.* **2007**, *170*, 1445–1453. [[CrossRef](#)]
15. Sahm, F.; Reuss, D.E.; Giannini, C. WHO 2016 classification: Changes and advancements in the diagnosis of miscellaneous primary CNS tumours. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **2018**, *44*, 163–171. [[CrossRef](#)]
16. Lassman, A.B.; Roberts-Rapp, L.; Sokolova, I.; Song, M.; Pestova, E.; Kular, R.; Mullen, C.; Zha, Z.; Lu, X.; Gomez, E.; et al. Comparison of biomarker assays for EGFR: Implications for precision medicine in patients with glioblastoma. *Clin. Cancer Res.* **2019**, *25*, 3259–3265. [[CrossRef](#)]
17. Anderson, M.G.; Falls, H.D.; Mitten, M.J.; Oleksijew, A.; Vaidya, K.S.; Boghaert, E.R.; Gao, W.; Palma, J.P.; Cao, D.; Chia, P.-L.; et al. Targeting Multiple EGFR-expressing Tumors with a Highly Potent Tumor-selective Antibody-Drug Conjugate. *Mol. Cancer Ther.* **2020**, *19*, 2117–2125. [[CrossRef](#)]
18. Kim, G.; Ko, Y.T. Small molecule tyrosine kinase inhibitors in glioblastoma. *Arch. Pharm. Res.* **2020**, *43*, 385–394. [[CrossRef](#)]
19. Lopez-Gines, C.; Gil-Benso, R.; Ferrer-Luna, R.; Benito, R.; Serna, E.; Gonzalez-Darder, J.; Quilis, V.; Monleon, D.; Celda, B.; Cerdá-Nicolas, M. New pattern of EGFR amplification in glioblastoma and the relationship of gene copy number with gene expression profile. *Modern Pathol.* **2010**, *23*, 856–865. [[CrossRef](#)]
20. Stichel, D.; Ebrahimi, A.; Reuss, D.; Schrimpf, D.; Ono, T.; Shirahata, M.; Reifenberger, G.; Weller, M.; Hänggi, D.; Wick, W.; et al. Distribution of EGFR amplification, combined chromosome 7 gain and chromosome 10 loss, and TERT promoter mutation in brain tumors and their potential for the reclassification of IDHwt astrocytoma to glioblastoma. *Acta Neuropathol.* **2018**, *136*, 793–803. [[CrossRef](#)]
21. Navarro, L.; Gil-Benso, R.; Megías, J.; Muñoz-Hidalgo, L.; San-Miguel, T.; Callaghan, R.C.; González-Darder, J.M.; López-Ginés, C.; Cerdá-Nicolás, M.J. Alteration of major vault protein in human glioblastoma and its relation with EGFR and PTEN status. *Neuroscience* **2015**, *297*, 243–251. [[CrossRef](#)]
22. An, Z.; Aksoy, O.; Zheng, T.; Fan, Q.-W.; Weiss, W.A. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFRvIII in glioblastoma (GBM): Signaling pathways and targeted therapies. *Oncogene* **2018**, *37*, 1561–1575. [[CrossRef](#)]
23. Parker, J.J.; Canoll, P.; Niswander, L.; Kleinschmidt-DeMasters, B.K.; Foshay, K.; Waziri, A. Intratumoral heterogeneity of endogenous tumor cell invasive behavior in human glioblastoma. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 18002. [[CrossRef](#)]
24. Muñoz-Hidalgo, L.; San-Miguel, T.; Megías, J.; Monleón, D.; Navarro, L.; Roldán, P.; Cerdá-Nicolás, M.; López-Ginés, C. Somatic copy number alterations are associated with EGFR amplification and shortened survival in patients with primary glioblastoma. *Neoplasia* **2020**, *22*, 10–21. [[CrossRef](#)]
25. Pedersen, M.W.; Tkach, V.; Pedersen, N.; Berezin, V.; Poulsen, H.S. Expression of a naturally occurring constitutively active variant of the epidermal growth factor receptor in mouse fibroblasts increases motility. *Int. J. Cancer* **2004**, *108*, 643–653. [[CrossRef](#)]
26. Feng, H.; Hu, B.; Vuori, K.; Sarkaria, J.N.; Furnari, F.B.; Cavenee, W.K.; Cheng, S.-Y. EGFRvIII stimulates glioma growth and invasion through PKA-dependent serine phosphorylation of Dock180. *Oncogene* **2014**, *33*, 2504–2512. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Keller, S.; Schmidt, M.H.H. EGFR and EGFRvIII promote angiogenesis and cell invasion in glioblastoma: Combination therapies for an effective treatment. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1295. [[CrossRef](#)]
28. Boisselier, B.; Dugay, F.; Belaud-Rotureau, M.-A.; Coutolleau, A.; Garcion, E.; Menei, P.; Guardiola, P.; Rousseau, A. Whole genome duplication is an early event leading to aneuploidy in IDH-wild type glioblastoma. *Oncotarget* **2018**, *9*, 36017–36028. [[CrossRef](#)]

29. Mao, X.; Hamoudi, R.A. Molecular and cytogenetic analysis of glioblastoma multiforme. *Cancer Genet. Cytogenet.* **2000**, *122*, 87–92. [[CrossRef](#)]
30. Jeuken, J.; Cornelissen, S.; Boots-Sprenger, S.; Gijsen, S.; Wesseling, P. Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification. *J. Mol. Diagn.* **2006**, *8*, 433–443. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Jeuken, J.; Sijben, A.; Alenda, C.; Rijntjes, J.; Dekkers, M.; Boots-Sprenger, S.; McLendon, R.; Wesseling, P. Robust Detection of EGFR Copy Number Changes and EGFR Variant III: Technical Aspects and Relevance for Glioma Diagnostics. *Brain Pathol.* **2009**, *19*, 661–671. [[CrossRef](#)]
32. González, J.R.; Carrasco, J.L.; Armengol, L.; Villatoro, S.; Jover, L.; Yasui, Y.; Estivill, X. Probe-specific mixed-model approach to detect copy number differences using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). *BMC Bioinform.* **2008**, *9*, 261. [[CrossRef](#)]
33. Gessi, M.; Hammes, J.; Lauriola, L.; Dörner, E.; Kirfel, J.; Kristiansen, G.; zur Muehlen, A.; Denkhau, D.; Waha, A.; Pietsch, T. GNA11 and N-RAS mutations: Alternatives for MAPK pathway activating GNAQ mutations in primary melanocytic tumours of the central nervous system. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **2013**, *39*, 417–425. [[CrossRef](#)]
34. Gessi, M.; Gielen, G.H.; Denkhau, D.; Antonelli, M.; Giangaspero, F.; zur Mühlen, A.; Japp, A.S.; Pietsch, T. Molecular heterogeneity characterizes glioblastoma with lipoblast/adipocyte-like cytology. *Virchows Arch.* **2015**, *467*, 105–109. [[CrossRef](#)]
35. Gan, H.K.; Kaye, A.H.; Luwor, R.B. The EGFRvIII variant in glioblastoma multiforme. *J. Clin. Neurosci.* **2009**, *16*, 748–754. [[CrossRef](#)]
36. Layfield, L.; Willmore, C.; Tripp, S.; Jones, C.; Jensen, R. Epidermal growth factor receptor gene amplification and protein expression in glioblastoma multiforme. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* **2006**, *14*, 91–96. [[CrossRef](#)]
37. Cerami, E.; Gao, J.; Dogrusoz, U.; Gross, B.E.; Sumer, S.O.; Aksoy, B.A.; Jacobsen, A.; Byrne, C.J.; Heuer, M.L.; Larsson, E.; et al. The cBio Cancer Genomics Portal: An open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* **2012**, *2*, 401–404. [[CrossRef](#)]
38. Brennan, C.W.; Verhaak, R.G.W.; McKenna, A.; Campos, B.; Nounshmehr, H.; Salama, S.R.; Zheng, S.; Chakravarty, D.; Sanborn, J.Z.; Berman, S.H.; et al. The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. *Cell* **2013**, *155*, 462–477. [[CrossRef](#)]
39. Szklarczyk, D.; Gable, A.L.; Lyon, D.; Junge, A.; Wyder, S.; Huerta-Cepas, J.; Simonovic, M.; Doncheva, N.T.; Morris, J.H.; Bork, P.; et al. STRING v11: Protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, D607–D613. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Ciriello, G.; Sinha, R.; Hoardley, K.A.; Jacobsen, A.S.; Reva, B.; Perou, C.M.; Sander, C.; Schultz, N. The molecular diversity of Luminal A breast tumors. *Breast Cancer Res. Treat.* **2013**, *141*, 409–420. [[CrossRef](#)]
41. Crespo, I.; Vital, A.L.; Nieto, A.B.; Rebelo, O.; Tão, H.; Lopes, M.C.; Oliveira, C.R.; French, P.J.; Orfao, A.; Taberero, M.D. Detailed characterization of alterations of chromosomes 7, 9, and 10 in glioblastomas as assessed by single-nucleotide polymorphism arrays. *J. Mol. Diagn.* **2011**, *13*, 634–647. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Sahin, A.; Sanchez, C.; Bullain, S.; Waterman, P.; Weissleder, R.; Carter, B.S. Development of third generation anti-EGFRvIII chimeric T cells and EGFRvIII-expressing artificial antigen presenting cells for adoptive cell therapy for glioma. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0199414. [[CrossRef](#)]
43. Kiang, K.M.-Y.; Leung, G.K.-K. A review on Adducin from functional to pathological mechanisms: Future direction in cancer. *BioMed Res. Int.* **2018**, 1–14. [[CrossRef](#)]
44. van den Boom, J.; Wolter, M.; Kuick, R.; Misk, D.E.; Youkilis, A.S.; Wechsler, D.S.; Sommer, C.; Reifemberger, G.; Hanash, S.M. Characterization of gene expression profiles associated with glioma progression using oligonucleotide-based microarray analysis and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Am. J. Pathol.* **2003**, *163*, 1033–1043. [[CrossRef](#)]
45. Huang, H.; Colella, S.; Kurrer, M.; Yonekawa, Y.; Kleihues, P.; Ohgaki, H. Gene expression profiling of low-grade diffuse astrocytomas by cDNA arrays. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 6868–6874.
46. Mariani, L.; Beaudry, C.; McDonough, W.S.; Hoelzinger, D.B.; Demuth, T.; Ross, K.R.; Berens, T.; Coons, S.W.; Watts, G.; Trent, J.M.; et al. Glioma cell motility is associated with reduced transcription of proapoptotic and proliferation genes: A cDNA microarray analysis. *J. Neurooncol.* **2001**, *53*, 161–176. [[CrossRef](#)]
47. Kiang, K.M.-Y.; Zhang, P.; Li, N.; Zhu, Z.; Jin, L.; Leung, G.K.-K. Loss of cytoskeleton protein ADD3 promotes tumor growth and angiogenesis in glioblastoma multiforme. *Cancer Lett.* **2020**, *474*, 118–126. [[CrossRef](#)]

48. Lechuga, S.; Amin, P.H.; Wolen, A.R.; Ivanov, A.I. Adducins inhibit lung cancer cell migration through mechanisms involving regulation of cell-matrix adhesion and cadherin-11 expression. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2019**, *1866*, 395–408. [[CrossRef](#)]
49. Sun, Q.; Pei, C.; Li, Q.; Dong, T.; Dong, Y.; Xing, W.; Zhou, P.; Gong, Y.; Zhen, Z.; Gao, Y.; et al. Up-regulation of MSH6 is associated with temozolomide resistance in human glioblastoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *496*, 1040–1046. [[CrossRef](#)]
50. Skiriute, D.; Vaitkiene, P.; Saferis, V.; Asmoniene, V.; Skauminas, K.; Deltuva, V.P.; Tamasauskas, A. MGMT, GATA6, CD81, DR4, and CASP8 gene promoter methylation in glioblastoma. *BMC Cancer* **2012**, *12*, 218. [[CrossRef](#)]
51. Hansen, L.J.; Sun, R.; Yang, R.; Singh, S.X.; Chen, L.H.; Pirozzi, C.J.; Moure, C.J.; Hemphill, C.; Carpenter, A.B.; Healy, P.; et al. MTAP Loss Promotes Stemness in Glioblastoma and Confers Unique Susceptibility to Purine Starvation. *Cancer Res.* **2019**, *79*, 3383–3394. [[CrossRef](#)]
52. Lubin, M.; Lubin, A. Selective killing of tumors deficient in methylthioadenosine phosphorylase: A novel strategy. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e5735. [[CrossRef](#)]
53. Marjon, K.; Cameron, M.J.; Quang, P.; Clasquin, M.F.; Mandley, E.; Kunii, K.; McVay, M.; Choe, S.; Kernysky, A.; Gross, S.; et al. MTAP Deletions in Cancer Create Vulnerability to Targeting of the MAT2A/PRMT5/RIOK1 Axis. *Cell Rep.* **2016**, *15*, 574–587. [[CrossRef](#)]
54. Tang, B.; Lee, H.-O.; An, S.S.; Cai, K.Q.; Kruger, W.D. Specific Targeting of MTAP-Deleted Tumors with a Combination of 2'-Fluoroadenine and 5'-Methylthioadenosine. *Cancer Res.* **2018**, *78*, 4386–4395. [[CrossRef](#)]
55. Kesarwani, P.; Prabhu, A.; Kant, S.; Chinnaiyan, P. Metabolic Remodeling Contributes Towards an Immune Suppressive Phenotype in Glioblastoma. *Cancer Immunol. Immunother.* **2019**, *68*, 1107–1120. [[CrossRef](#)]
56. Ciaglia, E.; Abate, M.; Laezza, C.; Pisanti, S.; Vitale, M.; Seneca, V.; Torelli, G.; Franceschelli, S.; Catapano, G.; Gazzo, P.; et al. Antiglioma effects of N6-isopentenyladenosine, an endogenous isoprenoid end product, through the downregulation of epidermal growth factor receptor. *Int. J. Cancer* **2017**, *140*, 959–972. [[CrossRef](#)]
57. Ciaglia, E.; Grimaldi, M.; Abate, M.; Scrima, M.; Rodriguez, M.; Laezza, C.; Ranieri, R.; Pisanti, S.; Ciuffreda, P.; Manera, C.; et al. The isoprenoid derivative N6-benzyladenosine CM223 exerts antitumor effects in glioma patient-derived primary cells through the mevalonate pathway. *Br. J. Pharmacol.* **2017**, *174*, 2287–2301. [[CrossRef](#)]
58. Qiu, X.-X.; Chen, L.; Wang, C.-H.; Lin, Z.-X.; Chen, B.-J.; You, N.; Chen, Y.; Wang, X.-F. The Vascular Notch Ligands Delta-Like Ligand 4 (DLL4) and Jagged1 (JAG1) Have Opposing Correlations with Microvascularization but a Uniform Prognostic Effect in Primary Glioblastoma: A Preliminary Study. *World Neurosurg.* **2016**, *88*, 447–458. [[CrossRef](#)]

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

5. DISCUSIÓN

El GB es el tumor cerebral más maligno en adultos. Los glioblastomas se caracterizan por alteraciones en los genes que controlan el crecimiento celular, la apoptosis, la angiogénesis y la invasión^{27,52,180}. Debido a que las células tumorales penetran en el tejido cerebral de su alrededor, una resección quirúrgica completa es prácticamente imposible y, a pesar de estas intervenciones, el pronóstico sigue siendo desfavorable. Además, la heterogeneidad intratumoral presente en el GB contribuye a la resistencia del cáncer a los fármacos debido a mecanismos subyacentes que no han sido bien entendidos¹⁸¹. Se necesitan nuevos tratamientos y estrategias, que sean capaces de poder identificar y destruir las células tumorales dispersas con gran precisión.

La alteración genética del **EGFR** es un componente esencial en el retrato de la mayoría de los GB apareciendo en el 57% de los tumores^{35,183}. Esta frecuencia es similar a lo que hemos encontrado para la amplificación de *EGFR* y la mutación de *EGFR* en este trabajo. Este hecho, junto con los resultados devastadores del GB, justifica la continua búsqueda de asociaciones en relación con los cambios de *EGFR* y las respuestas terapéuticas de los pacientes. A la luz del proyecto TCGA, las alteraciones de RTK, así como las mutaciones en sus efectores posteriores son de interés potencial en la búsqueda de tratamientos dirigidos¹⁸⁴. Sin embargo, esto podría ser especialmente interesante para ser capaces de clasificar a nuestros pacientes en función de cambios específicos comunes o, incluso mejor, de diferentes vías afectadas, para entender qué les hace dar como resultado un desarrollo de la enfermedad más o menos rápido.

El uso de iFISH para determinar con precisión el estado de amplificación de *EGFR* es el actual test de referencia en GB^{60,185}. Trabajos anteriores nuestros y de otros grupos de investigación, demostraron que este método permite la detección de niveles intermedios de amplificación^{60,186}. Lassman y sus colegas profundizaron en la posibilidad de la búsqueda de diferentes técnicas nuevas en comparación con iFISH con resultados positivos¹⁸⁵. En el presente trabajo, hemos comparado el potencial de la MLPA para ese fin porque es una técnica sencilla y con una buena

relación coste-efectividad. El resultado de concordancia calculado con el índice kappa de Cohen que obtuvimos en nuestro trabajo también fue bueno. El objetivo de iFISH recae en la posibilidad de separar ese grupo amplificado de forma intermedia, para el cual no está del todo claro si representa una progresión a través del estado de amplificación o una vía separada para la progresión tumoral en GB. En cualquier caso, la MLPA demuestra ser una técnica rápida y fácil y, con la ventaja adicional de poder ser capaces de determinar variantes mutantes como es *EGFRvIII*, de acuerdo con trabajos previos¹⁸⁶⁻¹⁸⁹.

La amplia **heterogeneidad de las células cancerígenas** es un reto común en términos de entender cómo detener el crecimiento tumoral. La evolución clonal de GB IDHwt y la adquisición de nuevas mutaciones representa un problema mayor a la hora de encontrar terapias efectivas^{1,183,190,191}. La técnica MLPA nos ha permitido determinar las variaciones en el número de copias (SCNA) de 45 marcadores moleculares. Esta heterogeneidad es patente en nuestro trabajo. De todos los loci analizados, encontramos **SCNA** en todos ellos en al menos un caso. La genética de los GB H-amp y los que muestran *EGFRvIII* ofrece un panorama que es estadísticamente diferente de sus contrarios N-amp/L-amp o *EGFRwt*, respectivamente. El análisis con la base de datos STRING correlaciona la SCNA con los glioblastomas *EGFR* amplificados y muestra que están estadísticamente asociados con la activación de la vía *NOTCH3* y con la regulación negativa de la adhesión célula-matriz. Crespo et al., utilizando arrays de alta densidad (500K) para la detección de SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms), consiguió una relevancia similar para el eje establecido con *MTAP*¹⁹². Se ha descrito que la expresión del gen mutado *EGFRvIII* en ausencia de *EGFRwt* nos lleva a la transformación de células in vitro y está correlacionado con un mal pronóstico en GB^{9,193,194}. En concordancia con ese trabajo, nuestro grupo de pacientes que presentó *EGFRvIII*, que es el de peor evolución, también mostró deterioro de los procesos de adhesión célula-matriz. A pesar de la alteración de diferentes grupos de genes, hemos encontrado una mayor frecuencia de *EGFRvIII* entre los glioblastomas amplificados con *EGFR*, de acuerdo con trabajos

previos^{186,195}, y hemos encontrado una asociación significativa entre **EGFRvIII y una disminución en la supervivencia**, lo que apoya descripciones anteriores¹⁹⁶⁻¹⁹⁸. La ausencia de este receptor mutante en el tejido normal convierte el *EGFRvIII* en un atractivo objetivo terapéutico en GB¹⁹³.

Sin embargo, las terapias dirigidas contra este tipo de receptores aún no han mostrado un claro beneficio clínico. Muchos factores dificultan el desarrollo de nuevas terapias, como la barrera hematoencefálica, la cual limita en muchos casos el acceso del agente terapéutico al tejido neural, así como la heterogeneidad del tumor, las mutaciones secundarias, así como la activación de vías de señalización compensatorias contribuyen a la resistencia. Una mejor comprensión de la red de señalización de EGFR, y sus interrelaciones con otras vías, son esenciales para aclarar los mecanismos de resistencia y crear mejores agentes terapéuticos.

En general, GB-IDHwt mostró una amplia heterogeneidad genética. Sin embargo, el análisis de conglomerados realizado, permitió una separación basada en la frecuencia de alteraciones detectadas por MLPA en tres grupos. De ellos, los dos que mostraron **amplificación de EGFR** ofrecieron resultados completamente diferentes, dependiendo de la presencia de alteraciones adicionales, como SCNA en *ADD3* y la variante III de *EGFR*. Estos dos cambios resultaron como biomarcadores independientes de mal pronóstico y su asociación estadística con C2 resalta el interés de explorar la agregación de alteraciones genéticas en él (Figura 31). Por lo tanto, de acuerdo con las sondas genéticas analizadas mediante MLPA, el análisis de agrupamiento hace que los GB se separen en tres grupos diferentes. El primer grupo (C1) ofrece una tasa baja de SCNA en comparación con el resto. El grupo 2 (C2) y el grupo 3 (C3) comparten una alta tasa de SCNA en *MTAP*, *CDKN2A*, *MSH6* y *EGFR*, de acuerdo con las descripciones anteriores¹⁹², sugiriendo que los GB de ambos grupos muestran alteraciones en los procesos metabólicos del ADN (estudiado por STRING). Sin embargo, el segundo grupo (C2) concentra la coexistencia de alteraciones de *EGFR* a través de la amplificación de *EGFR* o *EGFRvIII* y tiene la tasa más

alta de SCNA. De estas, hay que destacar JAG1 que está involucrado en la angiogénesis¹⁹⁹, *MVP*, que recientemente estuvo implicado en el tráfico de vesículas¹⁸⁷ o el anteriormente citado *ADD3*. En coherencia con estos datos, este clúster mostró la supervivencia global más corta (Figura 31).

En cuanto a *MTAP*, su deficiencia se ve normalmente como un efecto colateral de la delección de *CDKN2A*, debido a su ubicación próxima a este gen^{200,201}. Sin embargo, es necesario mejorar nuestra comprensión de las consecuencias de esta pérdida porque podría ofrecer diferentes enfoques terapéuticos. Se sabe que la pérdida de *MTAP* tiene influencia en el metabolismo del ATP: tanto la adenina como la adenosina se alteran como consecuencia de la interrupción de la vía de rescate de poliaminas^{202,203}. Este hecho podría estar relacionado con la estrategia de reprogramación metabólica para modular de forma activa el escenario inmunológico de GB²⁰⁴. Al contrario de lo esperado, se observó que la adenosina no se acumula de manera significativa en GB²⁰⁴. Este hecho podría estar relacionado en línea con descripciones previas de N6-isopenteniladenosina y otros nucleósidos modificados, con importantes efectos antiproliferativos y proapoptóticos en casos de GB que muestran amplificación en *EGFR*^{205,206}. En nuestro estudio, los conglomerados 2 y 3 mostraron amplificaciones en *EGFR* y pérdidas en *CDKN2A* en todos los casos, además de una alta proporción de casos que mostraron pérdidas de *MTAP*. Sería deseable realizar un estudio en mayor profundidad de si la eficacia de esas moléculas pudiera representar un beneficio terapéutico para aquellos pacientes específicos con alteraciones del metabolismo de la adenosina.

Un hecho notable es que *ADD3* y *EGFRvIII*, ambos previamente reportados como alteraciones asociadas con una menor supervivencia en GB^{197,207} y confirmados aquí, son una característica en este C2. *ADD3* codifica la γ -aducina, que construye heterotetrámeros con sus contrapartes α - y β -aducina, y ha sido ampliamente estudiado en las membranas de los glóbulos rojos²⁰⁸. Diferentes trabajos se centran en el controvertido rol de la aducina bien como oncogén o como supresor

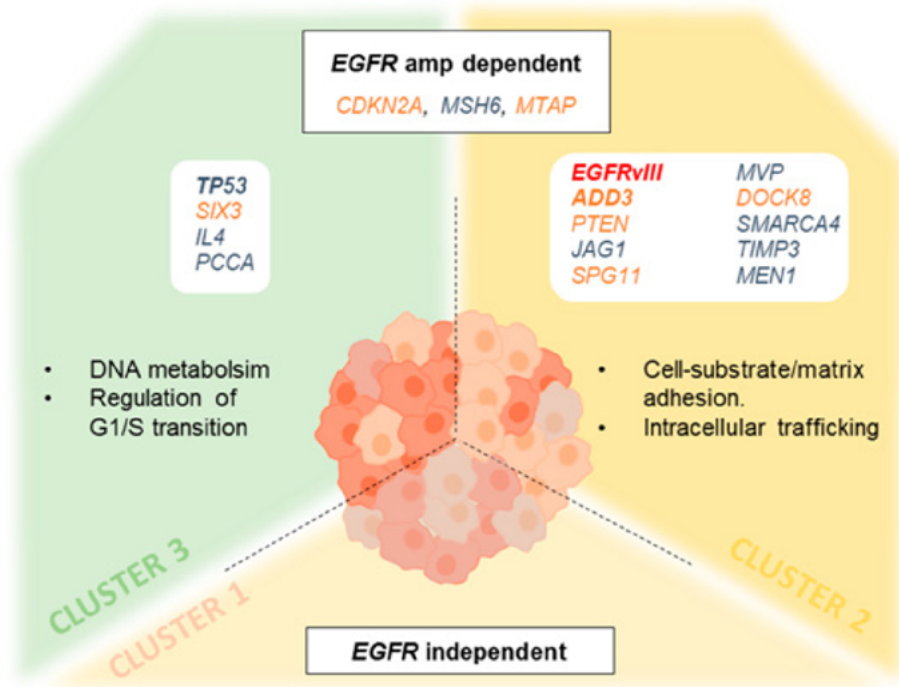


Figura 31. Rutas definidas por el análisis de agrupamiento. La introducción de los genes que contribuyeron a separar diferencialmente a los clústers en la plataforma de análisis de la base de datos STRING ofreció una variedad de vías y procesos genéticos que fueron especialmente alterados en C2 y C3. Los genes en azul muestran ganancias, los genes en naranja muestran pérdidas. Los genes en negrita fueron los más distintivos entre los grupos. La principal diferencia entre C2/C3 y C1 es que en C1, las alteraciones del *EGFR* se encontraron solo en la mitad de los casos.

de tumores en el cáncer²⁰⁸⁻²¹¹. Nuestros hallazgos apoyan un informe reciente de Kiang KM et al. que apunta a la disminución de *ADD3* en GB, pero no en la de los gliomas menos malignos, como un evento crítico durante la progresión maligna²⁰⁷. Mientras que la mayoría de los estudios basados en células sugieren un comportamiento oncogénico, diferentes artículos sobre muestras de tumores de glioma, de acuerdo con nuestros datos, relacionan la disminución de *ADD3* con la progresión^{210,211} y la migración²⁰⁹. Otros cánceres que muestran amplificación de *EGFR*, como el cáncer de pulmón de células no pequeñas, comparten esta infraexpresión de *ADD3* asociada con la migración celular²¹².

Y con respecto al clúster C3 se observaron alteraciones de *TP53* además de las compartidas. Este hecho tiene todo el sentido considerando que las mutaciones en *TP53* son, según la OMS, más frecuentes en el grupo de GB con mutaciones en *IDH*, caracterizado por una mayor supervivencia que en los GB *IDHwt*¹. Además, *EGFRvIII* se ha asociado ampliamente con un peor resultado^{196,197}. Estos hallazgos reflejan que, no solo el estado de amplificación de *EGFR* podría ser decisivo en la comprensión de la progresión del GB, sino también la interconexión que se establece con las vías genéticas paralelas (Figura 31).

Una comparación entre los principales hallazgos en los grupos definidos aquí y los **subtipos de expresión TCGA** previamente reportados^{34,35} merece algunos comentarios: el pequeño conjunto de casos de GB *IDH* mutado que estudiamos podría encajar en el grupo TCGA **proneural**, con mutaciones en *TP53* en la mitad de las muestras y una pérdida de *PTEN* en 2/3 de los casos. De manera similar, la esperanza de vida es mayor, tal y como se espera al presentar la mutación en *IDH*¹. El grupo 2 encajaría bastante bien en el **subtipo "clásico"**^{34,35}. La amplificación del *EGFR* es la característica principal acompañada de pérdidas en *CDKN2A* en todos los casos y pérdidas en *PTEN* en una alta proporción (88%). Sin embargo, el grupo 3 parece ser una variante de este subtipo clásico. También se caracteriza por la amplificación *EGFR* y las pérdidas en *CDKN2A*, pero las pérdidas en *PTEN* se reducen a la mitad. Sin embargo, otras alteraciones lo definen mejor que el estado *PTEN*, como son las ganancias en *TP53* o las pérdidas en *SIX3*. Cabe mencionar que *TP53* destaca, pero lo hace por *SCNA*, y no por mutaciones, tal y como sería más característico del subtipo mesenquimatoso TCGA^{34,35}.

Por tanto, entre estos dos clústers se ofrece una mayor definición genética de los pacientes. Hay que destacar que el subgrupo C1 parece tener poco que ver con *EGFR*, en contraste con C2 y C3. C1 coincide con el subtipo **mesenquimatoso**, siendo el único grupo de pacientes que no se caracterizan por amplificación de *EGFR*. Este muestra una compleja mezcla de cambios genéticos sin que ninguno de ellos sea dominante,

todos ellos en proporciones más bajas que sus contrarios clúster 2 y 3, y de forma similar a como ocurre en el subtipo mesenquimatoso TCGA^{34,35}. Por ambos lados, los subgrupos de GB dependientes del estado de *EGFR*, se pueden separar al ser genéticamente y clínicamente diferentes. La identificación de alteraciones en los nodos compartidos de convergencia en los efectores posteriores de los RTK ha sido un interesante enfoque en el cáncer^{183,190}.

Por otra parte, en nuestro estudio, ***EGFRvIII* está relacionado con la amplificación de *MVP*** en aproximadamente el 75% de los tumores. Además, si se consideran las muestras con *EGFRvIII* no amplificado, *MVP* se amplifica en casi el 90% de los tumores. Estos hallazgos indican una posible contribución del *MVP* en el mal pronóstico predicho de los GB con mutación *EGFRvIII*. Según nuestros resultados, no se ha encontrado correlación entre los tres tipos de amplificación del gen *EGFR* definidas previamente⁶⁰ y la alteración del número de copias del gen *MVP*.

Los datos publicados disponibles sugieren que la expresión de las partículas vaults y sus componentes se incrementan con frecuencia en una amplia variedad de tumores resistentes a diversos fármacos²¹³. Dado que la resistencia farmacológica es una de las razones críticas que nos llevan al fracaso de las quimioterapias contra el cáncer, la eliminación de *MVP* parece ser un enfoque válido para incrementar el acceso de los fármacos al núcleo con el objetivo de conseguir una mayor eficiencia citotóxica²¹⁴. Además, la expresión de *MVP* se correlacionó con el grado de malignidad en ciertos tipos de cáncer, sugiriendo su participación directa en el desarrollo y/o progresión tumoral²¹⁵. Los valores de *MVP* en las líneas celulares y tumores cancerígenos de diferente origen histológico, incluyendo al GB han sido analizados^{215,216}. Basado en el hallazgo de que *MVP* se une a diversas fosfatasas y quinasas, incluidas PTEN, SHP-2, así como ERK, refuerza la evidencia de que *MVP* podría estar involucrado en la regulación de importantes vías de señalización celular, incluidas las vías *PI3K/AKT* y *MAPK*²¹⁷. En el presente trabajo también observamos que hay una relación inversamente proporcional

significativa entre las copias de **MVP y la dosis de PTEN**. De hecho, los tumores con menos copias de *MVP* se corresponden con mayores valores de *PTEN* con ganancias o amplificaciones.

Además, se ha descrito por primera vez que niveles bajos de dosis del gen *MVP* se correlacionan con mayores tasas de supervivencia en pacientes tratados con quimioterapia, lo que sugiere que un mayor número de copias de este gen puede contribuir a una menor eficiencia del tratamiento y a un peor pronóstico del tumor^{213,218}. Este hallazgo contribuye a aumentar la evidencia de que la sobredosis genética de *MVP* y la sobreexpresión posterior interfieren con el tratamiento al aumentar la producción de partículas vaults y eliminar las moléculas de quimioterapia. Tomados en conjunto, nuestros resultados sugieren un papel importante de *MVP* en la mala respuesta de GB a la quimioterapia y destacan este gen como un factor valioso en el pronóstico de los tumores de GB y un objetivo novedoso e interesante para nuevos enfoques de tratamiento.

El presente trabajo plantea la MLPA como una metodología ventajosa, simple y útil para muestras parafinadas. Además, puede proporcionar nuevos conocimientos sobre los fundamentos moleculares de la patogénesis del GB de manera integral. Agrupar las alteraciones genéticas de GB resalta la importancia del *EGFR* en este tipo de tumor tan agresivo y podría representar un gran paso hacia la medicina de precisión: la agregación de cambios dependiendo de la presencia de la amplificación de *EGFR*, la mutación variante III o ambas simultáneamente, conducen a diferentes vías para analizar. Nuestros resultados subrayan la importancia de *EGFRvIII* y las SCNA *ADD3* como marcadores de mal pronóstico que necesitan más consideración en GB. La presencia de un grupo de GB-IDHwt sin alteraciones en *EGFR* puede explicar parte de la ausencia de efecto de los inhibidores de RTK en este tipo de tumor. Además, la clara separación de los GB relacionados con *EGFR* amplificado, que muestra conjuntos de genes que están alterados diferencialmente, apunta a la necesidad de repensar las posibilidades de la terapia

personalizada en entornos clínicos futuros. Los grupos diferenciales que se pueden establecer podrían usarse para una terapia más precisa.

Además de las mutaciones que pueden afectar las vías de señalización críticas, también los cambios epigenéticos pueden contribuir al desarrollo de tumores. La metilación de la región promotora puede provocar el silenciamiento de la transcripción del gen afectado, lo que podría ser crucial para el funcionamiento normal²¹⁹.

Dentro de los biomarcadores asociados al GB se encuentran el estado de metilación de diferentes genes, especialmente es determinante el análisis del estado de metilación del promotor del gen *MGMT*, ya que es el mejor marcador predictivo para el tratamiento con agentes alquilantes, donde hoy en día TMZ es el principal compuesto utilizado^{13,40,175,182}.

En este estudio hemos centrado la atención en **la metilación del promotor *ARF1***, por estar relacionada de manera estadísticamente significativa con **la amplificación del gen *EGFR*, la infiltración tumoral y el metabolismo del recambio de membrana**. Hasta donde sabemos, esta es la primera documentación de una asociación entre la **metilación de *ARF1* y la biología del GB**.

El Factor de ADP Ribosilación (ARF) son proteínas que constituyen una pequeña familia de GTPasas, que comprenden seis isoformas, las cuales regulan el tráfico vesicular y la estructura de los orgánulos reclutando proteínas de cubierta, regulando el metabolismo de los fosfolípidos y organizando el citoesqueleto de la actina en la superficie de las membranas. Entre estas proteínas, ARF1 y ARF6 son las que mejor están descritas. El ARF6 se localiza en la membrana plasmática y está relacionada con la endocitosis del receptor y la remodelación de la actina, mientras que el ARF1 se asocia de manera clásica con el aparato de Golgi²²⁰. Durante la migración, la interacción de las vías de señalización intracelulares provoca la remodelación del citoesqueleto de la actina para formar protuberancias de membrana, y las pequeñas GTPasas de las familias Rho y ARF se han caracterizado como agentes

principales en la regulación de este proceso²²¹⁻²²⁴. La asociación entre la familia de proteínas ARF y el cáncer ha sido bien establecida en las células tumorales in vitro^{222,225} y en neoplasias primarias incluyendo el melanoma²²⁶, cáncer de pulmón²²⁷, cáncer de mama²²⁸, cáncer gástrico²²⁹ y cánceres neuroendocrinos²³⁰. Hasta el momento, el papel que desempeñan estas proteínas en estos cánceres no está claro. Una alta expresión de ARF1 en las células de cáncer gástrico está significativamente asociada con la progresión tumoral y los estadios avanzados de la enfermedad, mientras que una baja expresión de ARF1 se ha asociado con un mejor pronóstico²²⁹.

Algunas de estas asociaciones podrían relacionarse con la activación de la vía *PI3K* por ARF1^{222,223}. Se ha detectado que en las células del glioma, la sobreexpresión de ARF6 mejora su migración^{231,232}. En el cáncer de mama, ARF1 y ARF6 se encontraron de manera simultánea y su activación está mediada por el factor de crecimiento epidérmico (EGF)^{233,234} y en el glioma *EGFR* parece estimular la expresión de ARF6²³⁵. En este estudio hemos descubierto asociaciones entre el incremento del metabolismo tumoral y la amplificación del gen *EGFR*, y entre la amplificación del gen *EGFR* y la metilación de *ARF1*, lo cual supone un papel potencial de *ARF1* en la progresión de GB. Nuestros datos muestran que la metilación del promotor del gen *ARF1* regula estrechamente su expresión y que este efecto está más acentuado en los tumores que muestran amplificación de *EGFR*.

La asociación biológica entre *EGFR* y *ARF1* es compleja. Nuestros resultados indican que la metilación del promotor *ARF1* y la amplificación de *EGFR* están asociadas en el GB. Los pacientes de GB incluidos en la base de datos del TCGA también mostraron una tendencia hacia una relación similar, pero no del todo coincidente. Hay diversas explicaciones posibles del porqué no se encontró una mayor relación en los datos de la TCGA. En primer lugar, el conjunto de datos TCGA está intrínsecamente sesgado hacia casos con grandes resecciones y tumores altamente viables, mientras que nosotros incluimos los casos sin tener en cuenta el tamaño del tumor ni el grado de necrosis. En segundo lugar, los

cambios en el número de copias en el TCGA fueron determinados mediante arrays para la detección de SNPs y fueron informados como ratio del log2. Si bien este análisis puede, en principio, ser análogo a la técnica FISH, es difícil extrapolar los puntos de corte del FISH con los obtenidos mediante el array de SNP.

A medida que las células migran se activan las vías de señalización intracelular y las familias ARF son los principales responsables en la regulación de este proceso. ARF1 desempeña un papel bien reconocido en la formación de vesículas y también influye en el ensamblaje de actina en el aparato de Golgi para facilitar la fusión de las membranas²²⁰. Estos procesos de tráfico de membranas y de remodelación del citoesqueleto de la actina, inciden en la migración y en el incremento del potencial de invasión de las células^{223,236}. Además, se sabe que ARF1 podría estar presente en los pliegues de la membrana plasmática junto con *EGFR*^{222,234}.

Uno de los problemas más importantes en la biopatología del GB y en el desarrollo terapéutico es la identificación de los mecanismos subyacentes en la infiltración de células tumorales. Las células tumorales de GB tienden a invadir los tejidos circundantes, bien individualmente o en grupos pequeños. Estudios previos basados en un modelo xenoinjerto ortotópico, que consiste en implantar en ratones inmunodeprimidos células tumorales en el mismo lugar donde se desarrolla el tumor en los humanos, han demostrado que los GB podrían mostrar dos tipos de comportamiento de crecimiento: (i) expansión de la masa tumoral y (ii) formación de nódulos tumorales o infiltraciones de células tumorales únicas altamente difusas,²³⁷⁻²³⁹. Muchos de los casos incluidos en nuestro estudio mostraron un patrón de infiltración difuso, principalmente en el grupo *EGFR* H-amp, el cual exhibió un menor grado de metilación en ARF1, hallazgo que podría estar relacionado con un comportamiento más agresivo del tumor.

La determinación de perfiles metabólicos en biopsias de tumores representa un enfoque poderoso para explorar la reprogramación metabólica. Las células tumorales reprograman las rutas metabólicas

para satisfacer la alta demanda de precursores para la proliferación replicando el comportamiento de las células proliferantes. Como parte de esta reprogramación metabólica, la vía Kennedy, que regula la producción de fosfolípidos para el recambio de membranas, está regulada al alza en los tumores y, por lo tanto, representa tanto un fuerte sello metabólico del cáncer como un excelente marcador de agresividad tumoral. La correlación entre el estado de *EGFR* y la vía Kennedy está bien establecida.

Nuestros datos de **metabolismo tumoral** sugieren que la amplificación del *EGFR* y la metilación de *ARF1* no solo están asociadas con cambios en el recambio de la membrana, sino también en la composición de la misma. Se cree que la colina y el inositol podrían tener doble función, tanto incrementando el recambio de la membrana como cambiando los ratios entre los diferentes componentes de la bicapa de la membrana, afectando así a sus propiedades físico-químicas. Sin embargo, la asociación observada entre la amplificación de *EGFR* y el metabolismo tumoral no se limita a los metabolitos de membrana.

Estudios previos han mostrado que la señalización de *EGFR* mediada por la vía PI3K/AKT incrementa los factores de transcripción que regulan la homeostasis lipídica, por ejemplo, la proteína de unión a elementos de respuesta a esteroides (SREBP-1), y regula la expresión de la enzima glucolítica piruvato quinasa M2²⁴⁰. Además, también se ha publicado que las células del GB producen lactato independientemente de la disponibilidad de oxígeno, proceso conocido como efecto Warburg²⁴¹, lo que les permite transformarse en más invasivas imitando un metabolismo altamente hipóxico.

Nuestros datos muestran que el conjunto de todos estos cambios metabólicos afectan a la producción de metabolitos donantes de metilo, incluyendo la leucina y la isoleucina. La posible conexión entre estos hallazgos y otros procesos celulares tales como la metilación del ADN y el tráfico de vesículas podrían estar relacionados con el papel que desempeña *ARF1* en la progresión del glioma, como se describió

anteriormente. Por tanto, el análisis metabólico de estos tumores podría sugerir una asociación entre la amplificación de *EGFR* y diferentes precursores de membrana y metabolitos donantes de metilo.

Nuestros resultados indican que la amplificación de *EGFR* está asociada con una red compleja de interacciones mediada por el ARF1 como son el recambio de membrana, la metilación del ADN y el tráfico de vesículas. Además, hemos encontrado que los casos con un patrón de crecimiento nodular no mostraron amplificación de *EGFR* o lo hicieron en niveles bajos, mientras que todos los tumores con niveles altos de amplificación de *EGFR* y con hipometilación de *ARF1* mostraron un patrón de crecimiento difuso. En definitiva, estos resultados sugieren una asociación entre la amplificación de *EGFR* y la metilación de *ARF1*, que podría estar correlacionada con la infiltración y el metabolismo tumoral.

Aunque los mecanismos y las consecuencias de estas asociaciones todavía deben ser resueltas, los resultados que se informan proporcionan una base para nuevas hipótesis que relacionan el tráfico de vesículas, el recambio de membranas y el metabolismo en las células tumorales del GB.

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas en esta tesis doctoral son:

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 determinación de marcadores moleculares tiene implicación en el diagnóstico, pronóstico y respuesta a tratamiento de los pacientes con glioblastoma.
3. La presencia de *EGFRvIII* y la pérdida del gen supresor de tumores *PTEN* contribuyen por sí mismos a aumentar la agresividad del GB, pero además podría estar correlacionado con la amplificación del gen *MVP*, de manera inversamente proporcional.
4. El incremento en la expresión de *MVP* es un factor pronóstico independiente de peor respuesta clínica a la quimioterapia y/o supervivencia global.
5. La agregación de cambios dependiendo de la presencia de la amplificación de *EGFR*, la mutación de la variante III o ambas simultáneamente, conducen a diferentes vías para analizar. Encontrando asociaciones estadísticamente significativas entre la amplificación de *EGFR* y/o *EGFRvIII*, y SCNA en *CDKN2A*, *MSH6*, *MTAP* y *ADD3*. Siendo tanto *EGFRvIII* como las pérdidas en *ADD3* marcadores independientes de mal pronóstico con significación significativa en nuestra serie.
6. 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.

7. 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 diferentes (C1, C2 y C3) de glioblastomas. Estos grupos presentaron similitudes y diferencias en las alteraciones detectadas y en la vías afectadas.
8. Los tres grupos de GB (C1, C2 y C3) no presentan diferencias estadísticamente significativas en términos de supervivencia. Por ello, la clasificación por este método no constituiría por sí misma una herramienta suficientemente práctica para su utilización en el contexto clínico diario.
9. 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.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Louis, 2016. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Ellison DW, et al. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System WHO/IARC Classification of Tumours, 2016, 4th Edition Revised, Volume 1. ISBN 9789283244929. Editorial World Health Organization.
2. Burger PC, Pearl DK, Aldape K, et al. Small cell architecture--a histological equivalent of *EGFR* amplification in glioblastoma multiforme? *J Neuropathol Exp Neurol*. 2001; 60(11):1099-1104. doi:10.1093/jnen/60.11.1099.
3. Sahm F, Capper D, Jeibmann A, et al. Addressing diffuse glioma as a systemic brain disease with single-cell analysis. *Arch Neurol*. 2012;69(4): 523-526. doi:10.1001/archneurol.2011.2910.
4. Wesseling P, Kros JM, Jeuken JWM. The pathological diagnosis of diffuse gliomas: towards a smart synthesis of microscopic and molecular information in a multidisciplinary context. *Diagn Histopathol*. 2011;17:486-494.
5. Ostrom QT, Gittleman H, Xu J, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2009-2013. *Neuro Oncol*. 2016;18 (suppl_5): v1-v75. doi:10.1093/neuonc/now207.
6. Stelzer KJ. Epidemiology and prognosis of brain metastases. *Surg Neurol Int*. 2013;4 (Suppl 4): S192-S202. Published 2013 May 2. doi: 10.4103/2152-7806.111296.
7. Perry, A., Brat, DJ. (2017). Practical surgical neuropathology: A diagnostic approach a volume in the pattern recognition series. Elsevier Inc.
8. Perry, A., Brat, DJ. (2010). Practical surgical neuropathology: A diagnostic approach. Philadelphia PA: Churchill Livingstone, Elsevier, 2010. ISBN 978-0-443-06982-6.
9. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system [published correction appears in *Acta Neuropathol*. 2007 Nov;114(5):547]. *Acta Neuropathol*. 2007;114(2):97-109. doi:10.1007/s00401-007-0243-4.
10. Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, Deltour I, Fisher JL, Langer CE, Pekmezci M, Schwartzbaum JA, Turner MC, Walsh KM, Wrensch MR,

- Barnholtz-Sloan JS. The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review. *Neuro Oncol.* 2014 Jul;16(7):896-913. doi: 10.1093/neuonc/nou087. PMID: 24842956; PMCID: PMC4057143.
11. Nobusawa S, Watanabe T, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. *Clin Cancer Res.* 2009;15(19):6002-6007. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0715.
 12. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol.* 170: 1445-1453 (2007).
 13. Malmstrom A, Gronberg BH, Marosi C, et al. Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with 69 glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. *The lancet oncology.* Sep 2012;13(9):916-926.
 14. Brown TJ, Brennan MC, Li M, et al. Association of the Extent of Resection With Survival in Glioblastoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol.* Nov 1 2016;2(11):1460-1469.
 15. Sancar F. Quick Uptakes: Sex-Specific Tumor Signatures Help Explain Differences in Glioblastoma Survival. *JAMA.* 2019;321(9):824-825. doi:10.1001/jama.2019.0432.
 16. Berghoff AS, Stefanits H, Woehrer A, et al. Clinical neuropathology practice guide 3-2013: levels of evidence and clinical utility of prognostic and predictive candidate brain tumor biomarkers. *Clin Neuropathol.* 2013;32(3):148-158. doi:10.5414/np300646.
 17. Stupp R, Taillibert S, Kanner A, et al. Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA: the journal of the American Medical Association.* Dec 19 2017;318(23):2306-2316.
 18. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, et al. Fluorescence-guided surgery with 5- aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *The lancet oncology.* May 2006;7(5):392-401.
 19. Pichlmeier U, Bink A, Schackert G, Stummer W, Group ALAGS. Resection and survival in glioblastoma multiforme: an RTOG

- recursive partitioning analysis of ALA study patients. *Neuro-oncology*. Dec 2008;10(6):1025-1034.
20. Vuorinen V, Hinkka S, Farkkila M, Jaaskelainen J. Debulking or biopsy of malignant glioma in elderly people - a randomised study. *Acta Neurochir (Wien)*. Jan 2003;145(1):5-10.
 21. Stupp R, Brada M, van den Bent MJ, Tonn JC, Pentheroudakis G; ESMO Guidelines Working Group. High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2014;25 Suppl 3:iii93-iii101. doi:10.1093/annonc/mdu050.
 22. Weller M, van den Bent M, Tonn JC, et al. European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. *The lancet oncology*. Jun 2017;18(6):e315-e329.
 23. Walker MD, Green SB, Byar DP, et al. Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery. *The New England journal of medicine*. Dec 4 1980;303(23):1323-1329.
 24. Silginer M, Weller M, Stupp R, Roth P. Biological activity of tumor-treating fields in preclinical glioma models. *Cell Death Dis*. Apr 20 2017;8(4):e2753.
 25. Weinberg RA. *The biology of cancer*. New York: Garland Science; 2007.
 26. Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281–297.
 27. Cancer Genome Atlas Research Network (2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455, 1061–1068. doi: 10.1038/nature07385.
 28. Sturm D, Bender S, Jones DT, Lichter P, Grill J, Becher O, et al. Paediatric and adult glioblastoma: Multiform (epi)genomic culprits emerge. *Nat Rev Cancer*. 2014;14:92–107. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3655>.
 29. Marusyk A, Almendro V, Polyak K. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer?. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(5):323-334. Published 2012 Apr 19. doi:10.1038/nrc3261.
 30. Brennan, C., Momota, H., Hambardzumyan, D., Ozawa, T., Tandon,

- A., Pedraza, A., et al. (2009). Glioblastoma subclasses can be defined by activity among signal transduction pathways and associated genomic alterations. *PLoS One* 4:e7752. doi: 10.1371/journal.pone.0007752.
31. Zhao, Z., Zhang, K., Wang, Q., Li, G., Zeng, F., Zhang, Y., et al. (2020). Chinese Glioma Genome Atlas (CGGA): a comprehensive resource with functional genomic data for chinese glioma patients. *bioRxiv* doi: 10.1101/2020.01.20.911982.
 32. McLendon, R. E., Friedman, A. H., Bigner, D. D., Van Meir, E. G., Brat, D. J., Mastrogianakis, G. M., et al. (2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455, 1061–1068. doi: 10.1038/nature07385.
 33. Parsons DW, Jones S, Zhang X et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 2008; 321(5897): 1807–1812.
 34. Verhaak, R. G., Hoadley, K. A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M. D., et al. (2010). An integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, *EGFR*, and NF1. *Cancer Cell* 17, 98–110. doi: 10.1016/j.ccr.2009.12.020.
 35. Brennan CW, Verhaak RG, McKenna A, et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma [published correction appears in *Cell*. 2014 Apr 24;157(3):753]. *Cell*.2013;155(2):462-477. doi:10.1016/j.cell.2013.09.034
 36. Sottoriva, A., Spiteri, I., Piccirillo, S. G. M., Touloumis, A., Collins, V. P., Marioni, J. C., Tavare, S. (2013). Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(10), 4009–4014. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219747110>.
 37. Meir, E. G. Van, C. G. Hadjipanayis, A. D. Norden, H. K. Shu, P. Y. Wen, and J. J. Olson. "Exciting New Advances in Neuro-Oncology: The Avenue to a Cure for Malignant Glioma." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 60.3 (2010): 166-9.
 38. Farias-Eisner, G., Bank, A. M., Hwang, B. Y., Appelboom, G., Piazza, M. a., Bruce, S. S., & Sander Connolly, E. (2012). Glioblastoma

- biomarkers from bench to bedside: advances and challenges. *British Journal of Neurosurgery*, 26(2), 189–194.
39. Sundar, S. J., Hsieh, J. K., Manjila, S., Lathia, J. D., & Sloan, A. (2014). The role of cancer stem cells in glioblastoma. *Neurosurgical Focus*, 37 (6), E6. <https://doi.org/10.3171/2014.9.FOCUS14494>.
 40. Hegi, M. E., Diserens, A., Gorlia, T., Hamou, M., De Tribolet, N., Weller, M., et al. (2005). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 2005. 352, 997–1003. doi:10.1056/NEJMoa043331.
 41. Etcheverry, A., Aubry, M., de Tayrac, M., Vauleon, E., Boniface, R., Guenot, F., et al. (2010). DNA methylation in glioblastoma: impact on gene expression and clinical outcome. *BMC Genomics* 11:701. doi: 10.1186/1471-2164-11-701.
 42. Romani, M., Pistillo, M. P., and Banelli, B. (2018). Epigenetic targeting of glioblastoma. *Front. Oncol.* 8:448. doi: 10.3389/fonc.2018.00448.
 43. Carella, A., Tejedor, J. R., García, M. G., Urdinguio, R. G., Bayon, G. F., Sierra, M., et al. (2020). Epigenetic downregulation of TET3 reduces genome-wide 5hmC levels and promotes glioblastoma tumorigenesis. *Int. J. Cancer* 146, 373–387. doi: 10.1002/ijc.32520.
 44. Lofton-Day, C., and Lesche, R. (2003). DNA methylation markers in patients with gastrointestinal cancers. *Digest. Dis.* 21, 299–308. doi: 10.1159/000075352.
 45. Christensen, B. C., Smith, A. A., Zheng, S., Koestler, D. C., Houseman, E. A., Marsit, C. J., et al. (2011). DNA methylation, isocitrate dehydrogenase mutation, and survival in glioma. *J. Natl. Cancer Instit.* 103, 143–153. doi: 10.1093/jnci/djq497.
 46. Skiriute D, Vaitkiene P, Saferis V, et al. MGMT, GATA6, CD81, DR4, and CASP8 gene promoter methylation in glioblastoma. *BMC Cancer*. 2012;12:218. Published 2012 Jun 6. doi:10.1186/1471-2407-12-218.
 47. De Riemenschneider MJ, Jeuken JW, Wesseling P, Reifenberger G. Molecular diagnostics of gliomas: state of the art. *Acta Neuropathol.* 2010;120(5):567-584. doi:10.1007/s00401-010-0736-4.

48. Balsl J, Meyer J, Mueller W et al. Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol* 2008; 116(6): 597–602.
49. Ichimura K, Pearson DM, Kocalkowski S et al. IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas. *Neuro Oncol* 2009; 11(4): 341–347.
50. Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *Am J Pathol* 2009; 174(4): 1149–1153.
51. Yan H, Parsons DW, Jin G et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med* 2009; 360(8): 765–773.
52. Ohgaki H, Burger P, Kleihues P. Definition of primary and secondary glioblastoma–response. *Clin Cancer Res* 2014; 20(7): 2013.
53. Hartmann C, Hentschel B, Wick W et al. 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* 2010; 120(6): 707–718.
54. Barthel FP, Wesseling P, Verhaak R. Reconstructing the molecular life history of gliomas. *Acta Neuropathol* 2018; 135(5): 649–670.
55. Waitkus MS, DiPlas BH, Yan H. Isocitrate dehydrogenase mutations in gliomas. *Neurooncology*. Jan 2016;18(1):16–26.
56. Malta TM, de Souza CF, Sabedot TS, et al. Glioma CpG island methylator phenotype (GCIMP): biological and clinical implications. *Neuro-oncology*. 2017;20(5):608–620.
57. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(2):85–95. doi:10.1038/nrc2981.
58. Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res*. 2013;19(4):764–772. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-3002.
59. Masui K, Mischel PS, Reifenberger G. Molecular classification of gliomas. *Handb Clin Neurol*. 2016;134:97–120. doi:10.1016/B978-0-12-802997-8.00006-2.
60. López C, Gil R, Ferrer R, Benito R, Serna E, González J, Quilis

- V, Monleón D, Celda B, Cerdá-Nicolás M. New pattern of *EGFR* amplification in glioblastoma and the relationship of gene copy number with gene expression profile. *Mod Pathol.* 23: 856-865 (2010).
61. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic Alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Sci.* 100: 2235-2241 (2009).
 62. Hatanpaa KJ, Burma S, Zhao D, Habib AA. Epidermal growth factor receptor in glioma: signal transduction, neuropathology, imaging, and radioresistance. *Neoplasia.* 2010;12(9):675-684. doi:10.1593/neo.10688.
 63. Yarden, Y. 2001. The *EGFR* family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer,* 37 Suppl 4, S3-S8.
 64. Zahonero C, Sánchez-Gómez P. EGFR-dependent mechanisms in glioblastoma: towards a better therapeutic strategy. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(18):3465-3488. doi:10.1007/s00018-014-1608-1.
 65. Du, Z., Lovly, C.M. Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Mol Cancer* 17, 58 (2018). <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0782-4>.
 66. Garrett T, McKern N, Lou M, Elleman T, Adams T, Lovrecz G, Zhu HJ, Walker F, Frenkel M, Hoyne P, Jorissen R, Nice E, Burgess A, Ward C. Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. *Cell* 110: 763-773 (2002).
 67. Furnari, F.B., Fenton, T., Bachoo, R.M., Mukasa, A., Stommel, J.M., Stegh, A., Hahn, W.C., Ligon, K.L., Louis, D.N., Brennan, C., Chin, L., DePinho, R.A., & Cavenee, W.K. 2007. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev.*, 21, (21) 2683-2710
 68. Riddick, G. & Fine, H.A. 2011. Integration and analysis of genome-scale data from gliomas. *Nat.Rev Neurol.*, 7, (8) 439-450.
 69. Marquez A, Wu R, Zhao J, Tao J, Shi Z. Evaluation of epidermal growth factor receptor (*EGFR*) by chromogenic in situ hybridization (CISH) and immunohistochemistry (IHC) in archival gliomas using bright-field microscopy. *Diagn Mol Pathol.* 13: 1-8 (2004).

70. Dei Tos AP, Ellis I. Assessing epidermal growth factor receptor expression in tumours: what is the value of current test methods?. *Eur J Cancer*. 2005;41(10):1383-1392. doi:10.1016/j.ejca.2005.03.018.
71. Kersting C, Packeisen J, Leidinger B, et al. Pitfalls in immunohistochemical assessment of *EGFR* expression in soft tissue sarcomas. *J Clin Pathol*. 2006;59(6):585-590. doi:10.1136/jcp.2005.028373.
72. López C, Cerdá M, Gil R, Pellin A, López J, Callaghan R, Benito R, Roldán P, Piquer J, Llàcer J, Barberà J. Association of chromosome 7, chromosome 10 and *EGFR* gene amplification in glioblastoma. *Clinical Neuropathol*. 24: 209-218 (2005).
73. Horbinski C, Miller CR, Perry A. Gone FISHing: clinical lessons learned in brain tumor molecular diagnostics over the last decade. *Brain Pathol*. 2011;21(1):57-73. doi:10.1111/j.1750-3639.2010.00453.
74. Chen JR, Xu HZ, Yao Y, Qin ZY. Prognostic value of epidermal growth factor receptor amplification and *EGFRvIII* in glioblastoma: meta-analysis. *Acta Neurol Scand*. 2015;132(5):310-322. doi:10.1111/ane.12401
75. Heimberger A.B., Hlatky, R., Suki, D., Yang, D., Weinberg, J., Gilbert, M., Sawaya, R., & Aldape, K. 2005. Prognostic effect of epidermal growth factor receptor and *EGFRvIII* in glioblastoma multiforme patients. *Clin Cancer Res*, 11, (4) 1462-1466.
76. Batchelor, T.T., Betensky, R.A., Esposito, J.M., Pham, L.D., Dorfman, M.V., Piscatelli, N., Jhung, S., Rhee, D., & Louis, D.N. 2004. Age-dependent prognostic effects of genetic alterations in glioblastoma. *Clin Cancer Res*, 10, (1 Pt 1) 228-233.
77. 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) 6962-6970.
78. Simmons, M.L., Lamborn, K.R., Takahashi, M., Chen, P., Israel, M.A., Berger, M.S., Godfrey, T., Nigro, J., Prados, M., Chang, S., Barker, F.G., & Aldape, K. 2001. Analysis of complex relationships

- between age, p53, epidermal growth factor receptor, and survival in glioblastoma patients. *Cancer Res*, 61, (3) 1122-1128.
79. Smith JS, Tachibana I, Passe SM, et al. PTEN mutation, *EGFR* amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93 (16):1246-1256. doi:10.1093/jnci/93.16.1246.
 80. Krex, D., Klink, B., Hartmann, C., von Deimling, A., Pietsch, T., Simon, M., Sabel, M., Steinbach, J.P., Heese, O., Reifenberger, G., Weller, M., & Schackert, G. 2007. Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain*, 130, (Pt 10) 2596-2606.
 81. Eis P, Tam W, Sun L, Chadburn A, Li Z, Gomez M, Lund E, Dahlberg J. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *PNAS* 102: 3627-3632 (2005).
 82. Fu J, Rodova M, Nanta R, Meeker D, Van Veldhuizen P, Srivastava R, Shankar S. NPV-LDE-225 (Erismodegib) inhibits epithelial mesenchymal transition and self-renewal of glioblastoma initiating cells by regulating miR-21, miR-128, and miR-200. *Neuro Oncol.* 15: 691-706 (2013).
 83. Rao R, James C. Altered molecular pathways in gliomas: an overview of clinically relevant issues. *Seminari Oncology* 31: 595-604 (2004).
 84. Shinojima N, Tada K, Shiraish S, Kamiryo T, Kochi M, Nakamura H, Makino K, Saya H,. Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma. *Cancer Res* 63: 6962-6970 (2003).
 85. Lee J, Vivanco I, Beroukhim R, Huang J, Feng W, DeBiasi RM, Yoshimoto K, King J, Nghiemphu P, Yuza Y, Xu Q, Greulich H, Thomas R, Paez J, Peck T, Linhart D, Glatt K, Getz G, Onofrio R, Ziaugra L, Levine R, Gabriel S, Kawaguchi T, O'Neill K. Epidermal growth factor receptor activation in glioblastoma through novel missense mutations in the extracellular domain. *PLoS Med* 3: 485 (2006).
 86. Sugawa N, Ekstrand A, James C, Collins V. Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas. *PNAS* 87: 8602-8606 (1990).

87. Frederick, L., Wang, X.Y., Eley, G., & James, C.D. 2000. Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. *Cancer Res*, 60, (5) 1383-1387.
88. Lammering G. Anti-epidermal growth factor receptor strategies to enhance radiation action. *Curr Med Chem Anticancer Agents*. 2003;3(5):327-333. doi:10.2174/1568011033482323.
89. Nagane M, Levitzki A, Gazit A, Cavenee WK, Huang HJ. Drug resistance of human glioblastoma cells conferred by a tumor-specific mutant epidermal growth factor receptor through modulation of Bcl-XL and caspase-3-like proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(10):5724-5729. doi:10.1073/pnas.95.10.5724.
90. Fan, Q.W., Cheng, C.K., Gustafson, W.C., Charron, E., Zipper, P., Wong, R.A., Chen, J., Lau, J., Knobbe-Thomsen, C., Weller, M., Jura, N., Reifemberger, G., Shokat, K.M., & Weiss, W.A. 2013. *EGFR* Phosphorylates Tumor-Derived *EGFRvIII* Driving *STAT3/5* and Progression in Glioblastoma. *Cancer Cell*, 24, (4) 438-449.
91. Li, L., Chakraborty, S., Yang, C.R., Hatanpaa, K.J., Cipher, D.J., Puliappadamba, V.T., Rehman, A., Jiwani, A.J., Mickey, B., Madden, C., Raisanen, J., Burma, S., Saha, D., Wang, Z., Pingle, S.C., Kesari, S., Boothman, D.A., & Habib, A.A. 2013. An *EGFR* wild type-*EGFRvIII*-HBEGF feed-forward loop regulates the activation of *EGFRvIII*. *Oncogene*.
92. Downward, J., Yarden, Y., Mayes, E., Scrace, G., Totty, N., Stockwell, P., Ullrich, A., Schlessinger, J., & Waterfield, M.D. 1984b. Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature*, 307, (5951) 521-527.
93. Narita, Y., Nagane, M., Mishima, K., Huang, H.J., Furnari, F.B., & Cavenee, W.K. 2002. Mutant epidermal growth factor receptor signaling down-regulates p27 through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway in glioblastomas. *Cancer Res*, 62, (22) 6764-6769.
94. Zhu, H., Acquaviva, J., Ramachandran, P., Boskovitz, A., Woolfenden, S., Pfannl, R., Bronson, R.T., Chen, J.W., Weissleder, R., Housman, D.E., & Charest, A. 2009. Oncogenic *EGFR* signaling cooperates with loss of tumor suppressor gene functions in gliomagenesis. *Proc. Natl*

- Acad.Sci U.S.A*, 106, (8) 2712-2716.
95. Prigent, S.A., Nagane, M., Lin, H., Huvar, I., Boss, G.R., Feramisco, J.R., Cavenee, W.K., & Huang, H.S. 1996. Enhanced tumorigenic behavior of glioblastoma cells expressing a truncated epidermal growth factor receptor is mediated through the Ras-Shc-Grb2 pathway. *J Biol.Chem.*, 271, (41) 25639-25645.
 96. Puliappadamba, V.T., Chakraborty, S., Chauncey, S.S., Li, L., Hatanpaa, K.J., Mickey, B., Noorani, S., Shu, H.K., Burma, S., Boothman, D.A., & Habib, A.A. 2013. Opposing effect of *EGFR*WT on *EGFR*VIII-mediated NF-kappaB activation with RIP1 as a cell death switch. *Cell Rep.*, 4, (4) 764-775.
 97. Huse J, Holland E. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Cancer* 10: 319-331(2010).
 98. 129. Huttner A. Overview of primary brain tumors: pathologic classification, epidemiology, molecular biology, and prognostic markers. *Hematol Oncol Clin North Am.* 26: 715-732 (2012).
 99. Aldape KD, Ballman K, Furth A, et al. Immunohistochemical detection of EGFRvIII in high malignancy grade astrocytomas and evaluation of prognostic significance. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2004;63(7):700-707. doi:10.1093/jnen/63.7.700.
 100. Wikstrand CJ, Hale LP, Batra SK, et al. Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas. *Cancer Res.* 1995;55(14):3140-3148.
 101. Dunn, G.P., et al., Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma. *Genes Dev*, 2012. 26(8): p. 756-84.
 102. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, et al. AKT phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell.* 1997;91(2):231-41. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80405-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80405-5).
 103. LoPiccolo J, Blumenthal GM, Bernstein WB, Dennis PA. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway: Effective combinations and clinical considerations. *Drug Resist Updat.* 2008;11(1-2):32-50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drug.2007.11.003>.

104. Tamura M, Gu J, Matsumoto K, Aota S, Parsons R, Yamada KM. Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science*. 1998;280(5369):1614–17. <http://dx.doi.org/10.1126/science.280.5369.1614>.
105. Chakravarti A, Tyndall E, Palanichamy K, Mehta M, Aldape K, Loeffler J. "Impact of molecularprofiling on clinical trial design for Glioblastoma". *Curr Oncol Rep*. 2007 Jan;9(1):71-9.
106. Wang C, Tong X, Yang F. "Bioengineered 3D brain tumor model to elucidate the effects of matrixstiffness on glioblastoma cell behavior using PEG-based hydrogels". *Mol Pharm*. 2014 Jul7;11(7):2115-25.
107. Feldkamp MM, Lala P, Lau N, Roncari L, Guha A. Expression of activated epidermal growth factor receptors, Ras-guanosine triphosphate, and mitogen-activated protein kinase in human glioblastoma multiforme specimens. *Neurosurgery*. 1999;45(6):1442-1453. doi:10.1097/00006123-199912000-00034.
108. Guha A, Feldkamp MM, Lau N, Boss G, Pawson A. Proliferation of human malignant astrocytomas is dependent on Ras activation. *Oncogene*. 1997;15(23):2755-2765. doi:10.1038/sj.onc.1201455.
109. Appin CL, Brat DJ. Biomarker-driven diagnosis of diffuse gliomas. *Mol Aspects Med*. 2015;45:87-96. doi:10.1016/j.mam.2015.05.002.
110. Arita H, Narita Y, Fukushima S et al. Upregulating mutations in the TERT promoter commonly occur in adult malignant gliomas and are strongly associated with total 1p19q loss. *Acta Neuropathol* 2013;126 (2): 267–276.
111. Killela PJ, Reitman ZJ, Jiao Y et al. TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(15): 6021–6026.
112. Koelsche C, Sahm F, Capper D et al. Distribution of TERT promoter mutations in pediatric and adult tumors of the nervous system. *Acta Neuropathol* 2013; 126(6): 907–915.

113. Ducrest AL, Szutorisz H, Lingner J, Nabholz M. Regulation of the human telomerase reverse transcriptase gene. *Oncogene*. 2002;21 (4):541-552. doi:10.1038/sj.onc.1205081.
114. Sahm F, Reuss D, Koelsche C et al. Farewell to oligoastrocytoma: in situ molecular genetics favor classification as either oligodendroglioma or astrocytoma. *Acta Neuropathol* 2014; 128(4): 551–559.
115. Suzuki H, Aoki K, Chiba K et al. Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas. *Nat Genet* 2015; 47 (5): 458–468.
116. Heaphy CM, de Wilde RF, Jiao Y, et al. Altered telomeres in tumors with ATRX and DAXX mutations. *Science*. 2011;333 (6041):425. doi:10.1126/science.1207313.
117. Reuss DE, Sahm F, Schimpf D et al. ATRX and IDH1-R132H immunohistochemistry with subsequent copy number analysis and IDH sequencing as a basis for an “integrated” diagnostic approach for adult astrocytoma, oligodendroglioma and glioblastoma. *Acta Neuropathol* 2015; 129(1): 133–146.
118. De Vleeschouwer S, ed. *Glioblastoma*. Brisbane (AU): Codon Publications; September 27, 2017.
119. LeBlanc VG, Marra MA. DNA methylation in adult diffuse gliomas. *Brief Funct Genomics* 2016;15 (6):491-500. doi:10.1093/bfpg/elw019.
120. Esteller M, García-Foncillas J, Andion E, et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 2000;343(19):1350-1354.
121. Rivera AL, Pelloski CE, Gilbert MR, et al. MGMT promoter methylation is predictive of response to radiotherapy and prognostic in the absence of adjuvant alkylating chemotherapy for glioblastoma. *Neuro Oncol* 2010;12(2):116-121. doi:10.1093/neuonc/nop020.
122. Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, et al. Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell* 2010;17(5):510-522. doi:10.1016/j.ccr.2010.03.017.
123. Pfeifer GP, Kadam S, Jin SG. 5-hydroxymethylcytosine and its

- potential roles in development and cancer. *Epigenetics Chromatin*. 2013;6(1):10. Published 2013 May 1. doi:10.1186/1756-8935-6-10.
124. Martínez-Cardús A, Vizoso M, Morán S, Manzano JL. Epigenetic mechanisms involved in melanoma pathogenesis and chemoresistance. *Ann Transl Med*. 2015;3: 209. doi:10.3978/j.issn.2305-5839.2015.06.20.
 125. Von Deimling A, Korshunov A, Hartmann C. The next generation of glioma biomarkers: MGMT methylation, BRAF fusions and IDH1 mutations. *Brain Pathol* 2011; 21: 74–87.
 126. Jansen M, Yip S, Louis DN. Molecular pathology in adult gliomas: diagnostic, prognostic, and predictive markers. *Lancet Neurol* 2010; 9: 717-26.
 127. Mansouri A, Hachem LD, Mansouri S, et al. MGMT promoter methylation status testing to guide therapy for glioblastoma: refining the approach based on emerging evidence and current challenges. *Neuro-oncology*. Sep 5 2018.
 128. Wick W, Weller M, van den Bent M, et al. MGMT testing--the challenges for biomarkerbased glioma treatment. *Nat Rev Neurol*. Jul 2014;10(7):372-385.
 129. Karayan-Tapon L, 2010. Prognostic value of O6-methylguanine-DNA methyltransferase status in glioblastoma patients, assessed by five different methods. *J Neurooncol* 2010; 97: 311–22.
 130. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 9821–6.
 131. Mikeska T, Bock C, El-Maarri O, Hubner A, Ehrentraut D, Schramm J, Felsberg J, Kahl P, Buttner R, Pietsch T, Waha A. Optimization of quantitative MGMT promoter methylation analysis using pyrosequencing and combined bisulfite restriction analysis. *J Mol Diagn* 2007; 9: 368–81.
 132. Jeuken JW, Cornelissen SJ, Vriezen M, Dekkers MM, Errami A, Sijben A, Boots-Sprenger SH, Wesseling P. MS-MLPA: an attractive alternative laboratory assay for robust, reliable, and semiquantitative detection of MGMT promoter hypermethylation in gliomas. *Lab Invest* 2007; 87: 1055–65.

133. Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet.* 2007;8(4):286-298. doi:10.1038/nrg2005.
134. Taby R, Issa JP. Cancer epigenetics. *CA Cancer J Clin.* 2010;60(6):376-392. doi:10.3322/caac.20085.
135. Doi A, Park IH, Wen B, et al. Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nat Genet.* 2009;41(12):1350-1353. doi:10.1038/ng.471.
136. Malzkorn B, Wolter M, Riemenschneider MJ, Reifenberger G. Unraveling the glioma epigenome: from molecular mechanisms to novel biomarkers and therapeutic targets. *Brain Pathol.* 2011;21(6):619-632. doi:10.1111/j.1750-3639.2011.00536.
137. Wang Y, Leung FC. An evaluation of new criteria for CpG islands in the human genome as gene markers. *Bioinformatics.* 2004;20(7):1170-1177. doi:10.1093/bioinformatics/bth059.
138. Cecener G, Tunca B, Egeli U, et al. The promoter hypermethylation status of GATA6, MGMT, and FHIT in glioblastoma. *Cell Mol Neurobiol.* 2012;32(2):237-244. doi:10.1007/s10571-011-9753-7.
139. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(15):8681-8686. doi:10.1073/pnas.96.15.8681.
140. Ehrich M, Nelson MR, Stanssens P, et al. Quantitative high-throughput analysis of DNA methylation patterns by base-specific cleavage and mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(44):15785-15790. doi:10.1073/pnas.0507816102.
141. 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. IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature.* 2012 Feb 15;483(7390):479-83. doi: 10.1038/nature10866. PMID: 22343889; PMCID: PMC3351699.

142. Van den Bent MJ. Interobserver variation of the histopathological diagnosis in clinical trials on glioma: a clinician's perspective. *Acta Neuropathol.* 2010;120(3):297-304. doi:10.1007/s00401-010-0725-7.
143. Miller BF, Sánchez-Vega F, Elnitski L. The Emergence of Pan-Cancer CIMP and Its Elusive Interpretation. *Biomolecules* 2016;6(4). doi:10.3390/biom6040045.
144. Suzuki H, Yamamoto E, Maruyama R, Niinuma T, Kai M. Biological significance of the CpG island methylator phenotype. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;455(1-2):35-42.doi:10.1016/j.bbrc.2014.07.007.
145. Hughes LA, Melotte V, de Schrijver J, et al. The CpG island methylator phenotype: what's in a name?. *Cancer Res.* 2013;73(19):5858-5868. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-4306.
146. Bowen BP, Northen TR. Dealing with the unknown: metabolomics and metabolite atlases. *J Am Soc Mass Spectrom* 2010;21:1471-6.
147. Mayr M. Metabolomics: ready for the prime time? *Circ Cardiovasc Genet* 2008;1:58-65.
148. Ryan D, Robards K. Metabolomics: The greatest omics of them all?. *Anal Chem.* 2006;78(23):7954-7958. doi:10.1021/ac0614341.
149. Sreekumar A, Poisson LM, Rajendiran TM, et al. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression [published correction appears in *Nature*. 2013 Jul 25;499(7459):504]. *Nature.* 2009;457(7231):910-914. doi:10.1038/nature07762.
150. Jain M, Nilsson R, Sharma S, et al. Metabolite profiling identifies a key role for glycine in rapid cancer cell proliferation. *Science.* 2012;336(6084):1040-1044. doi:10.1126/science.1218595.
151. Weckwerth W, Fiehn O. Can we discover novel pathways using metabolomic analysis?. *Curr Opin Biotechnol.* 2002;13(2):156-160. doi:10.1016/s0958-1669(02)00299-9.
152. Zhang GF, Sadhukhan S, Tochtrop GP, Brunengraber H. Metabolomics, pathway regulation, and pathway discovery. *J*

- Biol Chem.* 2011;286(27):23631-23635. doi:10.1074/jbc.R110.171405.
153. GoldsmithP, FentonH, Morris-StiffG,AhmadN, Fisher J, PrasadKR. Metabonomics: a useful tool for the future surgeon. *J Surg Res* 2010;160:122–32.
 154. Spratlin JL, Serkova NJ, Eckhardt SG. Clinical applications of metabolomics in oncology: a review. *Clin Cancer Res* 2009;15:431–40.
 155. Monleón, J.M. Morales, A. González-Segura, J.M. González-Darder, R. Gil-Benso, M. Cerdá-Nicolás, C. López-Ginés, Metabolic aggressiveness in benign meningiomas with chromosomal instabilities. *Cancer Res* 70, 8426–8434 (2010).
 156. E. Serna, J.M. Morales, M. Mata, J. González-Darder, T. San Miguel, R. Gil-Benso, C. López-Ginés, M. Cerdá-Nicolás, D. Monleón, Gene expression profiles of metabolic aggressiveness and tumor recurrence in benign meningioma. *PLoS One* 8(6), e67291 (2013).
 157. Auslander N, Wagner A, Oberhardt M, Ruppin E. Data-Driven Metabolic Pathway Compositions Enhance Cancer Survival Prediction. *PLoS Comput Biol.* 2016;12(9):e1005125. Published 2016 Sep 27. doi:10.1371/journal.pcbi.1005125.
 158. S. Walenta, N.F. Voelxen, W. Mueller-Klieser, Lactate-an integrative mirror of cancer metabolism. *Recent Results Cancer Res* 207, 23–37 (2016).
 159. Haynes HR, Camelo-Piragua S, Kurian KM. Prognostic and predictive biomarkers in adult and pediatric gliomas: toward personalized treatment. *Front Oncol.* 2014;4:47. Published 2014 Mar 24. doi:10.3389/fonc.2014.00047.
 160. Cairncross JG, Wang M, Jenkins RB, et al. Benefit from procarbazine, lomustine, and vincristine in oligodendroglial tumors is associated with mutation of IDH. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* Mar 10 2014;32(8):783-790.
 161. Van den Bent MJ, Brandes AA, Taphoorn MJ, et al. Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine chemotherapy in newly diagnosed anaplastic oligodendroglioma: long-term follow-up of

- EORTC brain tumor group study 26951. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. Jan 20 2013;31(3):344-350.
162. Capper D, Stichel D, Sahm F, et al. Practical implementation of DNA methylation and copynumber- based CNS tumor diagnostics: the Heidelberg experience. *Acta neuropathologica*. Aug 2018;136(2):181-210.
163. Capper D, Jones DTW, Sill M, et al. DNA methylation-based classification of central nervous system tumours. *Nature*. Mar 22 2018;555(7697):469-474.
164. Baumert BG, Hegi ME, van den Bent MJ, et al. Temozolomide chemotherapy versus radiotherapy in high-risk low-grade glioma (EORTC 22033-26033): a randomised, open-label, phase 3 intergroup study. *The lancet oncology*. Nov 2016;17(11):1521-1532.
165. Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, et al. Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *Journal of the National Cancer Institute*. Oct 7 1998;90(19):1473-1479.
166. Jenkins RB, Blair H, Ballman KV, et al. 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*. 2006;66(20):9852-9861. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1796.
167. Hoang-Xuan K, Capelle L, Kujas M, et al. Temozolomide as initial treatment for adults with low-grade oligodendrogliomas or oligoastrocytomas and correlation with chromosome 1p deletions. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. Aug 1 2004;22(15):3133-3138.
168. Pekmezci M, Rice T, Molinaro AM, et al. Adult infiltrating gliomas with WHO 2016 integrated diagnosis: additional prognostic roles of ATRX and TERT. *Acta neuropathologica*. Jun 2017;133(6):1001-1016.
169. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System:

- a summary. *Acta neuropathologica*. Jun 2016;131(6):803-820.
170. Mosrati MA, Malmstrom A, Lysiak M, et al. TERT promoter mutations and polymorphisms as prognostic factors in primary glioblastoma. *Oncotarget*. Jun 30 2015;6(18):16663-16673.
 171. Shirahata M, Ono T, Stichel D, et al. Novel, improved grading system(s) for IDH-mutant astrocytic gliomas. *Acta neuropathologica*. Jul 2018;136(1):153-166.
 172. Reis GF, Pekmezci M, Hansen HM, et al. CDKN2A loss is associated with shortened overall survival in lower-grade (World Health Organization Grades II-III) astrocytomas. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. May 2015;74(5):442-452.
 173. Malmstrom A, Poulsen HS, Gronberg BH, et al. Postoperative neoadjuvant temozolomide before radiotherapy versus standard radiotherapy in patients 60 years or younger with anaplastic astrocytoma or glioblastoma: glioblastoma: a randomized trial. *Acta Oncol*. Dec 2017;56(12):1776-1785.
 174. Wick W, Platten M, Meisner C, et al. Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *The lancet oncology*. Jul 2012;13(7):707-715.
 175. Perry JR, Laperriere N, O'Callaghan CJ, et al. Short-Course Radiation plus Temozolomide in Elderly Patients with Glioblastoma. *The New England journal of medicine*. Mar 16 2017;376(11):1027-1037.
 176. Rich JN, Rasheed BK, Yan H. EGFR mutations and sensitivity to gefitinib. *N Engl J Med*. 2004;351(12):1260-1261.
 177. Zhang P, Xia Q, Liu L, Li S, Dong L. Current Opinion on Molecular Characterization for GBM Classification in Guiding Clinical Diagnosis, Prognosis, and Therapy. *Front Mol Biosci*. 2020;7:562798. Published 2020 Sep 8. doi:10.3389/fmolb.2020.562798.
 178. Szklarczyk, D.; Gable, A.L.; Lyon, D.; Junge, A.; Wyder, S.; Huerta-Cepas, J.; Simonovic, M.; Doncheva, N.T.; Morris, J.H.; Bork, P.; et al. STRING v11: Protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res*. 2019, 47, D607–D613.

179. Umehara, T.; Arita, H.; Yoshioka, E.; Shofuda, T.; Kanematsu, D.; Kinoshita, M.; Kodama, Y.; Mano, M.; Kagawa, N.; Fujimoto, Y.; et al. Distribution differences in prognostic copy number alteration profiles in IDH-wild-type glioblastoma cause survival discrepancies across cohorts. *Acta Neuropathol. Commun.* 2019, 7, 99.
180. TCGA (The Cancer Genome Atlas Research Network), Molecular profiling reveals biologically discrete subsets and pathways of progression in diffuse glioma. *Cell* 164, 550–563 (2016).
181. Nathanson DA, Gini B, Mottahedeh J, Visnyei K, Koga T, Gómez G, et al. (2013) Targeted therapy resistance mediated by dynamic regulation of extrachromosomal mutant EGFR DNA. *Science* 343:72–76.
182. Weller M, Stupp R, Reifenberger G, Brandes AA, van den Bent MJ, Wick W, Hegi ME. MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nat Rev Neurol* 2010; 6: 39–51.
183. Furnari, F.B.; Cloughesy, T.F.; Cavenee, W.K.; Mischel, P.S. Heterogeneity of epidermal growth factor receptor signalling networks in glioblastoma. *Nat. Rev. Cancer* 2015, 15, 302–310.
184. Ciriello, G.; Sinha, R.; Hoadley, K.A.; Jacobsen, A.S.; Reva, B.; Perou, C.M.; Sander, C.; Schultz, N. The molecular diversity of Luminal A breast tumors. *Breast Cancer Res. Treat.* 2013, 141, 409–420.
185. Lassman, A.B.; Roberts-Rapp, L.; Sokolova, I.; Song, M.; Pestova, E.; Kular, R.; Mullen, C.; Zha, Z.; Lu, X.; Gomez, E.; et al. Comparison of biomarker assays for *EGFR*: Implications for precision medicine in patients with glioblastoma. *Clin. Cancer Res.* 2019, 25, 3259–3265.
186. Muñoz-Hidalgo L, San-Miguel T, Megías J, Monleón D, Navarro L, Roldán P, Cerdá-Nicolás M, López-Ginés C. Somatic copy number alterations are associated with *EGFR* amplification and shortened survival in patients with primary glioblastoma. *Neoplasia*. 2020 Jan;22(1):10-21. doi: 10.1016/j.neo.2019.09.001. Epub 2019 Nov 18. PMID: 31751860; PMCID: PMC6864306.
187. Navarro, L.; Gil-Benso, R.; Megías, J.; Muñoz-Hidalgo, L.; San-

- Miguel, T.; Callaghan, R.C.; González-Darder, J.M.; López-Ginés, C.; Cerdá-Nicolás, M.J. Alteration of major vault protein in human glioblastoma and its relation with *EGFR* and *PTEN* status. *Neuroscience* 2015, 297, 243–251.
188. Jeuken, J.; Sijben, A.; Alenda, C.; Rijntjes, J.; Dekkers, M.; Boots-Sprenger, S.; McLendon, R.; Wesseling, P. Robust Detection of *EGFR* Copy Number Changes and *EGFR* Variant III: Technical Aspects and Relevance for Glioma Diagnostics. *Brain Pathol.* 2009, 19, 661–671.
189. Gan, H.K.; Kaye, A.H.; Luwor, R.B. The *EGFR*vIII variant in glioblastoma multiforme. *J. Clin. Neurosci.* 2009, 16, 748–754.
190. Gerlinger, M.; Rowan, A.J.; Horswell, S.; Math, M.; Larkin, J.; Endesfelder, D.; Gronroos, E.; Martinez, P.; Matthews, N.; Stewart, A.; et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N. Engl. J. Med.* 2012, 366, 883–892.
191. Parker, J.J.; Canoll, P.; Niswander, L.; Kleinschmidt-DeMasters, B.K.; Foshay, K.; Waziri, A. Intratumoral heterogeneity of endogenous tumor cell invasive behavior in human glioblastoma. *Sci. Rep.* 2018, 8, 18002.
192. Crespo, I.; Vital, A.L.; Nieto, A.B.; Rebelo, O.; Tão, H.; Lopes, M.C.; Oliveira, C.R.; French, P.J.; Orfao, A.; Taberner, M.D. Detailed characterization of alterations of chromosomes 7, 9, and 10 in glioblastomas as assessed by single-nucleotide polymorphism arrays. *J. Mol. Diagn.* 2011, 13, 634–647.
193. Nishikawa R, Sugiyama T, Narita Y, Furnari F, Cavenee WK, Matsutani M (2004) Immunohistochemical analysis of the mutant epidermal growth factor, delta*EGFR*, in glioblastoma. *Brain Tumor Pathol* 21:53–56.
194. Layfield, L.; Willmore, C.; Tripp, S.; Jones, C.; Jensen, R. Epidermal growth factor receptor gene amplification and protein expression in glioblastoma multiforme. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 2006, 14, 91–96.
195. Hochberg, F.H.; Atai, N.A.; Gonda, D.; Hughes, M.S.; Mawejje, B.; Balaj, L.; Carter, R.S. Glioma diagnostics and biomarkers: An

- ongoing challenge in the field of medicine and science. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2014, 14, 439–452.
196. An, Z.; Aksoy, O.; Zheng, T.; Fan, Q.-W.; Weiss, W.A. Epidermal growth factor receptor (*EGFR*) and *EGFRvIII* in glioblastoma (GBM): Signaling pathways and targeted therapies. *Oncogene* 2018, 37, 1561–1575.
 197. Keller, S.; Schmidt, M.H.H. *EGFR* and *EGFRvIII* promote angiogenesis and cell invasion in glioblastoma: Combination therapies for an effective treatment. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 1295.
 198. Sahin, A.; Sánchez, C.; Bullain, S.; Waterman, P.; Weissleder, R.; Carter, B.S. Development of third generation anti-*EGFRvIII* chimeric T cells and *EGFRvIII*-expressing artificial antigen presenting cells for adoptive cell therapy for glioma. *PLoS ONE* 2018, 13, e0199414.
 199. Qiu, X.-X.; Chen, L.; Wang, C.-H.; Lin, Z.-X.; Chen, B.-J.; You, N.; Chen, Y.; Wang, X.-F. The Vascular Notch Ligands Delta-Like Ligand 4 (*DLL4*) and Jagged1 (*JAG1*) Have Opposing Correlations with Microvascularization but a Uniform Prognostic Effect in Primary Study. *World Neurosurg.* 2016; 88:447-458. doi: 10.1016/j.wneu.2015.10.058.
 200. Hansen, L.J.; Sun, R.; Yang, R.; Singh, S.X.; Chen, L.H.; Pirozzi, C.J.; Moure, C.J.; Hemphill, C.; Carpenter, A.B.; Healy, P.; et al. *MTAP* Loss Promotes Stemness in Glioblastoma and Confers Unique Susceptibility to Purine Starvation. *Cancer Res.* 2019, 79, 3383–3394.
 201. Lubin, M.; Lubin, A. Selective killing of tumors deficient in methylthioadenosine phosphorylase: A novel strategy. *PLoS ONE* 2009, 4, e5735.
 202. Marjon, K.; Cameron, M.J.; Quang, P.; Clasquin, M.F.; Mandley, E.; Kunii, K.; McVay, M.; Choe, S.; Kernytsky, A.; Gross, S.; et al. *MTAP* Deletions in Cancer Create Vulnerability to Targeting of the *MAT2A/PRMT5/RIOK1* Axis. *Cell Rep.* 2016, 15, 574–587.
 203. Tang, B.; Lee, H.-O.; An, S.S.; Cai, K.Q.; Kruger, W.D. Specific Targeting of *MTAP* -Deleted Tumors with a Combination of

- 20-Fluoroadenine and 50-Methylthioadenosine. *Cancer Res.* 2018, 78, 4386–4395.
204. Kesarwani P, Prabhu A, Kant S, Chinnaiyan P. Metabolic remodeling contributes towards an immune-suppressive phenotype in glioblastoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2019;68(7):1107-1120. doi:10.1007/s00262-019-02347-3.
205. Ciaglia E, Abate M, Laezza C, et al. Antiglioma effects of N6-isopentenyladenosine, an endogenous isoprenoid end product, through the downregulation of epidermal growth factor receptor. *Int J Cancer.* 2017;140(4):959-972. doi:10.1002/ijc.30505.
206. Ciaglia E, Grimaldi M, Abate M, et al. The isoprenoid derivative N6-benzyladenosine CM223 exerts antitumor effects in glioma patient-derived primary cells through the mevalonate pathway. *Br J Pharmacol.* 2017;174(14):2287-2301. doi:10.1111/bph.13824.
207. Kiang, K.M.-Y.; Zhang, P.; Li, N.; Zhu, Z.; Jin, L.; Leung, G.K.-K. Loss of cytoskeleton protein *ADD3* promotes tumor growth and angiogenesis in glioblastoma multiforme. *Cancer Lett.* 2020, 474, 118–126.
208. Kiang, K.M.-Y.; Leung, G.K.-K. A review on Adducin from functional to pathological mechanisms: Future direction in cancer. *BioMed Res. Int.* 2018, 1–14.
209. Mariani, L.; Beaudry, C.; McDonough, W.S.; Hoelzinger, D.B.; Demuth, T.; Ross, K.R.; Berens, T.; Coons, S.W.; Watts, G.; Trent, J.M.; et al. Glioma cell motility is associated with reduced transcription of proapoptotic and proliferation genes: A cDNA microarray analysis. *J. Neurooncol.* 2001, 53, 161–176.
210. van den Boom, J.; Wolter, M.; Kuick, R.; Misek, D.E.; Youkilis, A.S.; Wechsler, D.S.; Sommer, C.; Reifenberger, G.; Hanash, S.M. Characterization of gene expression profiles associated with glioma progression using oligonucleotide-based microarray analysis and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Am. J. Pathol.* 2003, 163, 1033–1043.
211. Huang, H.; Colella, S.; Kurrer, M.; Yonekawa, Y.; Kleihues, P.; Ohgaki, H. Gene expression profiling of low-grade diffuse astrocytomas by cDNA arrays. *Cancer Res.* 2000, 60, 6868–6874.

212. Lechuga, S.; Amin, P.H.; Wolen, A.R.; Ivanov, A.I. Adducins inhibit lung cancer cell migration through mechanisms involving regulation of cell-matrix adhesion and cadherin-11 expression. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 2019, 1866, 395–408.
213. Xu D, Areström I, Virtala R, Pisa P, Peterson C, Gruber A. High levels of lung resistance related protein mRNA in leukaemic cells from patients with acute myelogenous leukaemia are associated with inferior response to chemotherapy and prior treatment with mitoxantrone. *Br J Haematol.* 1999;106(3):627-633. doi:10.1046/j.1365-2141.1999.01611.
214. Van den Heuvel-Eibrink MM, Sonneveld P, Pieters R (2000) The prognostic significance of membrane transport-associated multidrug resistance (MDR) proteins in leukemia. *Int J Clin Pharmacol Ther* 38:94–110.
215. Lötsch D, Steiner E, Holzmann K, Spiegl-Kreinecker S, Pirker C, Hlavaty J, et al. (2013) Major vault protein supports glioblastoma survival and migration by upregulating the *EGFR/PI3K* signalling axis. *Oncotarget* 4:1904–1918.
216. Park K (2012) The role of major vault protein (*MVP*) in drug resistance. *J Control Release* 163:266.
217. Steiner E, Holzmann K, Elbling L, Micksche M, Berger W. Cellular functions of vaults and their involvement in multidrug resistance. *Curr Drug Targets.* 2006;7(8):923-934. doi:10.2174/138945006778019345.
218. Scheffer GL, Wijngaard PL, Flens MJ, Izquierdo MA, Slovak ML, Pinedo HM, et al. (1995) The drug resistance-related protein LRP is the human major vault protein. *Nat Med* 1:578–582.
219. Weinberg RA. *The biology of cancer.* New York: Garland Science; 2007.
220. C. D'Souza-Schorey, P. Chavrier, ARF proteins: Roles in membrane traffic and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 347–358 (2006).
221. H.J. Sabe, Requirement for Arf6 in cell adhesion, migration, and cancer cell invasion. *Biochemist* 134, 485–489 (2003).
222. P.L. Boulay, M. Cotton, P. Melançon, A. Claing, ADP-ribosylation factor 1 controls the activation of the phosphatidylinositol

- 3-kinase pathway to regulate epidermal growth factor-dependent growth and migration of breast cancer cells. *J Biol Chem* 283, 36425–36434 (2008).
223. P.L. Boulay, A. Claing, ARF proteins: Molecular switches controlling tumour proliferation and metastasis. *Med Sci* 25, 783–785 (2009).
224. D. Wolczyk, M. Zaremba-Czogalla, A. Hryniewicz-Jankowska, R. Tabola, K. Grabowski, A.F. Sikorski, K. Augoff, TNF- α promotes breast cancer cell migration and enhances the concentration of membrane-associated proteases in lipid rafts. *Cell Oncol* 39, 353–363 (2016).
225. S. Lewis-Saravalli, S. Campbell, A. Claing, ARF1 controls Rac1 signaling to regulate migration of MDA-MB-231 invasive breast cancer cells. *Cell Signal* 25, 1813–1819 (2013).
226. V. Muralidharan-Chari, H. Hoover, J. Clancy, J. Schweitzer, M.A. Suckow, V. Schroeder, F.J. Castellino, J.S. Schorey, C. D'Souza-Schorey, ADP-ribosylation factor 6 regulates tumorigenic and invasive properties in vivo. *Cancer Res* 69, 2201–2209 (2009).
227. S. Oka, H. Uramoto, H. Shimokawa, S. Yamada, F. Tanaka, Epidermal growth factor receptor-GEP100-Arf6 axis affects the prognosis of lung adenocarcinoma. *Oncology* 86, 263–270 (2014).
228. H. Sabe, S. Hashimoto, M. Morishige, E. Ogawa, A. Hashimoto, J.M. Nam, K. Miura, H. Yano, Y. Onodera, The *EGFR*-GEP100- Arf6-AMAP1 signaling pathway specific to breast cancer invasion and metastasis. *Traffic* 10, 982–993 (2009).
229. M.M. Tsai, P.Y. Lin, W.L. Cheng, C.Y. Tsai, H.C. Chi, C.Y. Chen, Y.H. Tseng, Y.F. Cheng, C.D. Chen, Y. Liang, C.J. Liao, S.M.Wu, Y.H. Lin, I.H. Chung, C.S. Wang, K.H. Lin, Overexpression of ADP-ribosylation factor 1 in human gastric carcinoma and its clinicopathological significance. *Cancer Sci* 103, 1136–1144 (2012).
230. C. Münzberg, K. Höhn, D. Krndija, U. Maaß, D.K. Bartsch, E.P. Slater, F. Oswald, P. Walther, T. Seufferlein, G. vonWichert, IGF-1 drives chromogranin a secretion via activation of Arf1 in human neuroendocrine tumour cells. *J Cell Mol Med* 19, 948–959 (2015).
231. M. Li, S.S. Ng, J. Wang, L. Lai, S.Y. Leung, M. Franco, Y. Peng,

- M.L. He, H.F. Kung, M.C. Lin, EFA6A enhances glioma cell invasion through ADP ribosylation factor 6/extracellular signalregulated kinase signaling. *Cancer Res* 66, 1583–1590 (2006).
232. B. Hu, B. Shi, M.J. Jarzynka, J.J. Yiin, C. D'Souza-Schorey, S.Y. Cheng, ADP-ribosylation factor 6 regulates glioma cell invasion through the IQ-domain GTPase-activating protein 1-Rac1-mediated pathway. *Cancer Res* 69, 794–801 (2009).
233. E. Haines, C. Saucier, A. Claing, The adaptor proteins p66Shc and Grb2 regulate the activation of the GTPases ARF1 and ARF6 in invasive breast cancer cells. *J Biol Chem* 289, 5687–5703 (2014).
234. S. Schlienger, S. Campbell, A. Claing, ARF1 regulates the rho/MLC pathway to control EGF-dependent breast cancer cell invasion. *Mol Biol Cell* 25, 17–29 (2014).
235. M. Li, J. Wang, S.S. Ng, C.Y. Chan, M.L. He, F. Yu, Y. Peng, M.L. He, H.F. Kung, M.C. Lin, Adenosine diphosphate-ribosylation factor 6 is required for epidermal growth factor-induced glioblastoma cell proliferation. *Cancer* 115, 4959–4972 (2009).
236. Y.V. Loskutov, P.Y. Kozyulina, V.K. Kozyreva, R.J. Ice, B.C. Jones, T.J. Roston, M.B. Smolkin, A.V. Ivanov, R.B. Wysolmerski, E.N. Pugacheva, NEDD9/Arf6-dependent endocytic trafficking of matrix metalloproteinase 14: A novel mechanism for blocking mesenchymal cell invasion and metastasis of breast cancer. *Oncogene* 34, 3662–3675 (2015).
237. C. Daumas-Duport, G. Szikla, Definition of limits and 3D configuration of cerebral gliomas. Histological data, therapeutic incidences (author's transl). *Neurochirurgie* 27, 273–284 (1981).
238. A. Claes, A.J. Idema, P. Wesseling, Diffuse glioma growth: A guerilla war. *Acta Neuropathol* 114, 443–458 (2007).
239. M. Monticone, A. Daga, S. Candiani, F. Romeo, V. Mirisola, S. Viaggi, I. Melloni, S. Pedemonte, G. Zona, W. Giaretti, U. Pfeffer, P. Castagnola, Identification of a novel set of genes reflecting different in vivo invasive patterns of human GBM cells. *BMC Cancer* 12, 358 (2012).
240. P. Ru, T.M. Williams, A. Chakravarti, D. Guo, Tumor metabolism of malignant gliomas. *Cancers (Basel)* 5, 1469–1484 (2013).

241. O. Keunen, M. Johansson, A. Oudin, M. Sanzey, S.A. Rahim, F. Fack, F. Thorsen, T. Taxt, M. Bartos, R. Jirik, H. Miletic, J. Wang, D. Stieber, L. Stuhr, I. Moen, C.B. Rygh, R. Bjerkvig, S.P. Niclou, Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 3749–3754 (2011).

Artículos como coautor no incluidos en esta tesis

- 1: San-Miguel T, **Navarro L**, Sánchez-Sendra B, Megías J, Muñoz-Hidalgo L, Santonja N, López-Ginés C, Cerdá-Nicolas M. Identification of a Novel BRCA1 Alteration in Recurrent Melanocytoma Resulting in Increased Proliferation. *JNeuropathol Exp Neurol*. 2020 Nov 1;79(11):1233-1238. doi: 10.1093/jnen/nlaa089. PMID: 32974655.
- 2: Sánchez-Sendra B, Serna E, **Navarro L**, González-Muñoz JF, Portero J, Ramos A, Murgui A, Monteagudo C. Transcriptomic identification of miR-205 target genes potentially involved in metastasis and survival of cutaneous malignant melanoma. *Sci Rep*. 2020 Mar 16;10(1):4771. doi: 10.1038/s41598-020-61637-4. PMID:32179834; PMCID: PMC7075905.
- 3: Sabater-Marco V, Santonja-López N, Ortiz-Zuluaga S, **Navarro-Cerveró L**, Orero-Castelló MT. Orbital soft tissue composite lymphoma presenting as recurrence of a nodal lymphoma with mantle and follicular cell components: A case report, literature review and guideline for the treatment of patients. *Rev Esp Patol*. 2020 Jan-Mar;53(1):48-54. doi: 10.1016/j.patol.2019.07.002. Epub 2019 Aug 22. PMID: 31932010.
- 4: Muñoz-Hidalgo L, San-Miguel T, Megías J, Monleón D, **Navarro L**, Roldán P, Cerdá-Nicolás M, López-Ginés C. Somatic copy number alterations are associated with *EGFR* amplification and shortened survival in patients with primary glioblastoma. *Neoplasia*. 2020 Jan;22(1):10-21. doi: 10.1016/j.neo.2019.09.001. Epub 2019 Nov 18. PMID: 31751860; PMCID: PMC6864306.
- 5: Sabater-Marco V, Ballester-Sánchez R, **Navarro-Cerveró L**, Fuster-Diana C, García-García JA, Botella-Estrada R. Primary cutaneous embryonal rhabdomyosarcoma with desmoplastic growth pattern and anaplastic lymphoma kinase overexpression. Report of a case with special emphasis on the differential diagnosis. *Clin Exp Dermatol*. 2019 Oct;44(7):822-824. doi: 10.1111/ced.13877. Epub 2018 Dec 30. PMID: 30597602.
- 6: Martínez-Ciarpaglini C, Fleitas-Kanonnikoff T, Gambardella V, Llorca M, Mongort C, Mengual R, Nieto G, **Navarro L**, Huerta M, Rosello

- S, Roda D, Tarazona N, Navarro S, Ribas G, Cervantes A. Assessing molecular subtypes of gastric cancer: microsatellite unstable and Epstein-Barr virus subtypes. Methods for detection and clinical and pathological implications. *ESMO Open*. 2019 May 27;4(3):e000470. doi: 10.1136/esmoopen-2018-000470. PMID: 31231566; PMCID: PMC6555614.
- 7: San-Miguel T, **Navarro L**, Megías J, Muñoz-Hidalgo L, Gil-Benso R, Roldán P, López-Ginés C, Cerdá-Nicolás M. Epigenetic changes underlie the aggressiveness of histologically benign meningiomas that recur. *Hum Pathol*. 2019 Feb;84:105-114. doi: 10.1016/j.humpath.2018.07.035. Epub 2018 Sep 25. PMID: 30261191.
- 8: Llorca-Cardenosa MJ, Fleitas T, Ibarrola-Villava M, Peña-Chilet M, Mongort C, Martínez-Ciarpaglini C, **Navarro L**, Gambardella V, Castillo J, Roselló S, Navarro S, Ribas G, Cervantes A. Epigenetic changes in localized gastric cancer: the role of RUNX3 in tumor progression and the immune microenvironment. *Oncotarget*. 2016 Sep 27;7(39):63424-63436. doi: 10.18632/oncotarget.11520. PMID: 27566570; PMCID: PMC5325374.
- 9: Machado I, **Navarro L**, Pellín A, Navarro S, Agaimy A, Tardío JC, Karseladze A, Petrov S, Scotlandi K, Picci P, Llombart-Bosch A. Defining Ewing and Ewing-like small round cell tumors (SRCT): The need for molecular techniques in their categorization and differential diagnosis. A study of 200 cases. *Ann Diagn Pathol*. 2016 Jun;22:25-32. doi: 10.1016/j.anndiagpath.2016.03.002. Epub 2016 Mar 14. PMID: 27180056.
- 10: Tardío JC, Machado I, **Navarro L**, Idrovo F, Sanz-Ortega J, Pellín A, Llombart-Bosch A. Ewing-like sarcoma with CIC-DUX4 gene fusion in a patient with neurofibromatosis type 1. A hitherto unreported association. *Pathol Res Pract*. 2015 Nov;211(11):877-82. doi: 10.1016/j.prp.2015.08.003. Epub 2015 Sep 8. PMID: 26386605.
- 11: San-Miguel T, Pinto S, **Navarro L**, Callaghan RC, Monteagudo C, López-Ginés C, Cerdá-Nicolás M, Gil-Benso R. Expression of the Chemokine Receptors CXCR3, CXCR4, CXCR7 and Their Ligands in Rhabdomyosarcoma. *Pathol Oncol Res*. 2015 Sep;21(4):1191-9. doi: 10.1007/s12253-015-9947-2. Epub 2015 Jun 3. PMID: 26037167.

- 12: Tarazona N, **Navarro L**, Cejalvo JM, Gambardella V, Pérez-Fidalgo JA, Sempere A, Navarro S, Cervantes A. Primary paraesophageal Ewing's sarcoma: an uncommon case report and literature review. *Onco Targets Ther.* 2015 May 14;8:1053-9. doi: 10.2147/OTT.S80879. PMID: 25999740; PMCID: PMC4437600.
- 13: Machado I, López-Soto MV, Rubio L, **Navarro L**, Llombart-Bosch A. Soft tissue myoepithelial carcinoma with rhabdoid-like features and EWSR1 rearrangement: Fine needle aspiration cytology with histologic correlation. *Diagn Cytopathol.* 2015 May;43(5):421-6. doi: 10.1002/dc.23259. Epub 2015 Feb 19. PMID: 25693574.
- 14: Muñoz-Hidalgo L, López-Ginés C, **Navarro L**, Callaghan RC, San Miguel T, Gil- Benso R, Quilis V, Botella L, González-Darder J, Cerdá-Nicolás M. BRAF V600E mutation in two distinct meningeal melanocytomas associated with a nevus of Ota. *J Clin Oncol.* 2014 Jul 10;32(20):e72-5. doi: 10.1200/JCO.2013.48.8718. Epub 2014 Feb 3. PMID: 24493731.
- 15: Monteagudo C, Ramos D, Pellín-Carcelén A, Gil R, Callaghan RC, Martín JM, Alonso V, Murgui A, **Navarro L**, Calabuig S, López-Guerrero JA, Jordá E, Pellín A. CCL27-CCR10 and CXCL12-CXCR4 chemokine ligand-receptor mRNA expression ratio:new predictive factors of tumor progression in cutaneous malignant melanoma. *Clin Exp Metastasis.* 2012 Aug;29(6):625-37. doi: 10.1007/s10585-012-9476-2. Epub 2012 Apr 21. PMID: 22526457.
- 16: Calabuig-Fariñas S, Benso RG, Szuhai K, Machado I, López-Guerrero JA, de Jong D, Peydró A, San Miguel T, **Navarro L**, Pellín A, Llombart-Bosch A. Characterization of a new human cell line (CH-3573) derived from a grade II chondrosarcoma with matrix production. *Pathol Oncol Res.* 2012 Oct;18(4):793-802. doi: 10.1007/s12253-012-9505-0. Epub 2012 Feb 15. PMID: 22350793.

Esta tesis se imprimió el 8 de junio de 2022,
Día Internacional de los Tumores Cerebrales



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA



Tesis doctoral para optar al grado de Doctor en Medicina

Valencia, 25 de mayo de 2022