



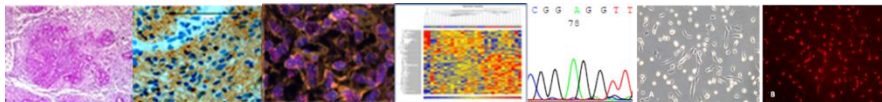
VNIVERSITATIS VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Patología

*Tesis doctoral para optar al grado
de Doctor en Medicina.*

**IMPACTO DEL miRNA-200c SOBRE EL MECANISMO DE MIGRACIÓN
CELULAR EN EL GLIOBLASTOMA. RELACIÓN CON LOS PATRONES
DE AMPLIFICACIÓN DE *EGFR*.**



Presentada por
Lisandra Muñoz Hidalgo

Dirigida
Prof. J. Miguel Cerdá Nicolás
Prof. Concepción López Ginés
Prof. Rosario Gil Benso

Valencia, diciembre de 2016

La tesis doctoral " **Impacto del miRNA-200c sobre el mecanismo de migración celular en el glioblastoma. Relación con los patrones de amplificación de EGFR.**" fue realizada en el Departamento de Patología. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Valencia, en colaboración con la Fundación Investigación Hospital Clínico de Valencia (INCLIVA).

Presentada por: Lisandra Muñoz Hidalgo

Lic. en Bioquímica y Máster en Investigación en Biología Molecular, Celular y Genética.

Directores:

Prof. J. Miguel Cerdá Nicolás. Catedrático Universitat de Valencia.

Profa. Concepción López Ginés. Catedrática Universitat de Valencia.

Profa. Rosario Gil Benso. Catedrática Universitat de Valencia.

Departamento de Patología. Facultad de Medicina y Odontología.

Los directores certifican que la tesis doctoral presentada por Lisandra Muñoz Hidalgo con el título: "*Impacto del miRNA-200c sobre el mecanismo de migración celular en el glioblastoma. Relación con los patrones de amplificación de EGFR.*" reúne los requisitos para su lectura y obtención del grado de doctor/a en Medicina. Y para que así conste se firma el presente certificado en Valencia a 12 de diciembre 2016.

Fdo: Prof. J. Miguel Cerdá Nicolás Fdo: Profa. Concepción López Ginés

Fdo: Profa. Rosario Gil Benso.

A mi hijo Alejandro

La posibilidad de realizar un sueño es lo que hace que la vida sea interesante... y hoy este es mi sueño.

Paulo Coelho.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera que estas palabras sirvieran para mostrar el agradecimiento que siento hacia todas las personas que me han ayudado en este largo camino que por supuesto no termina aquí y por cada día tener el placer de compartir con todos ellos.

Como no puede ser de otra forma primero agradecer a mis tutores Miguel Cerdá, Concha López y Rosario Gil, por darme la oportunidad de formar parte de este grupo de investigación y haber confiado en mí para este proyecto y apoyarme en todo momento para lograr mi superación como profesional.

A Miguel por ser siempre un jefe cercano, por ser un gran tutor y por todo lo que he aprendido junto a él y que he podido poner en práctica para que todo fuera muy bien, y por el apoyo y los consejos que siempre he recibido de su parte.

A Concha por la dedicación que siempre ha tenido conmigo, con este trabajo, por ser tan buena persona, siempre con un gesto amable y cercano, con una palabra acertada y por ser una tutora y directora de tesis excepcional, porque trabajar contigo es un privilegio y una gran satisfacción.

A Rosario agradecerle siempre su apoyo incondicional y su sabiduría para lograr que siempre el trabajo saliera adelante encontrando una solución a todo, enseñándome en todo momento a mejorar y hacer mi trabajo mejor cada día.

A todos mis compañeros de trabajo, GRACIAS, por estar ahí:

A Ana Clari porque ha sido más que una compañera, de la cual he aprendido mucho sobre todo de cultivos celulares y de otras técnicas del laboratorio que me han servido para ser mejor profesional.

A Teresa San Miguel que desde mis comienzos ha sido un gran apoyo y ayuda a la que acudir y en la cual guiarme, porque siempre he podido contar contigo y porque te aprecio mucho.

A Lara Navarro, por su apoyo cuando siempre se le necesita, por siempre estar ahí, por ayudarme y enseñarme muchas cosas que sin su ayuda y consejos no hubiese podido hacer, por ser una gran compañera.

A Eva Serna una excelente investigadora, por ayudarme tanto en mis inicios y por enseñarme a estudiar los miRNAs.

A Javier Megías por ser un gran compañero, por su ayuda y por sus magníficas correcciones.

A todas mis compañeras las técnicas de PROMETEO como cariñosamente las recordaré, que codo a codo estuvimos trabajando en este proyecto y en otros muchos. A María porque entramos juntas a este laboratorio y aprendimos tantas cosas, y sobre todo yo de ti que eres una profesional preparada y eficiente. A Amparo porque me ayudaste cuando realmente lo estaba pasando mal con mi embarazo y gracias a ti el proyecto pudo seguir adelante, en ese tiempo fuiste mi mano derecha y todo salió genial. A Sandra que a pesar de lo joven que es admiro su dedicación al trabajo, su eficiencia y su ayuda, te mereces lo mejor. A Amara mi actual compañera por todo su apoyo en la recta final y porque podamos seguir compartiendo juntas.

A mis compañeros de pasillo, de hora de comer, de departamento que los admiro mucho, Beatriz Sánchez, Bea de Fisio, Irene, Susana, Maite, Victor, Rebeca, Eli, Ana, Marta, Mariela, Robert, Lara, Javier Martín, Teresa Sagrado, Manolo Mata, Manolo Pino, Gema, Jose Benavent, Merche, Rosa, Javier Boix, Augusto, Dani, a Jose Manuel, Yésica, Itziar, Silvia, a Paco Argüelles. A Juani por darme los buenos días cada mañana y ser tan alegre.

A todos los compañeros del Servicio de Anatomía Patológica, en especial a Richard por su ayuda con el FISH, a Laura por ser siempre tan amable y enseñarme a hacer inmunes, a Alejo por sus consejos y su apoyo, a Carolina, María Ángeles, Esther, Elena y Cristina. A las secretarias del servicio en especial a Evelyn. A mis compañeros de la Fe, a Eva, a Beatricce, Rosa, Dolors, por todo lo que aprendí de ellos. Agradecer a los compañeros de INCLIVA, en las áreas de contabilidad, recursos humanos, cursos y formación, y otras.

Al profesor José Bermúdez por su apoyo en la estadística, agradecer a Jaime Font de Mora por todo lo que aprendí en su laboratorio que me servirá como profesional, al profesor Horacio Martinetto por sus buenos consejos profesionales. A todos mis profesores por la formación que me han dado.

A Sistemas genómicos y a la Cátedra Universitat / Sistemas genómicos por reconocer nuestro trabajo y otorgarme el Premio a la Innovación Genética.

Finalmente y no por ello, menos importante, a toda mi familia, a mi familia cubana a mi mamá, a mi hermano, a mi abuelo, a mis tíos y primos , por todo su apoyo y ayuda y sus palabras alentadoras en cada momento A mi familia española por acogerme como una más y por preocuparse por mí. A mi marido Ernesto por ser mi compañero de viaje por apoyarme en todo y por estar siempre ahí, a mi pequeñito Alejandro por ser la inspiración de mi día a día, a mis suegros por su apoyo, a mis sobrinitos, a mis cuñadas, a la tías por ser tan cercanas y a todos mis amigos.

Agradecerles a todos el cariño, el apoyo que en cada momento he recibido de cada uno,

GRACIAS

Lisandra

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Tumores gliales: Glioblastoma.....	1
1.1.1 Aspectos clínicos.....	1
1.1.2 Neuropatología.....	4
1.1.3 Variantes dentro del GB.....	7
1.1.4 Características inmunohistoquímicas.....	8
1.2 Características genéticas: del estudio citogenético al estudio molecular	9
1.2.1Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR): Características y papel en la biopatología del glioblastoma.....	12
1.2.1.1 Estructura y dimerización.....	12
1.2.1.2 Amplificación del <i>EGFR</i>	14
1.2.1.3 Valor pronóstico y terapéutico de la amplificación de <i>EGFR</i> en el glioblastoma.....	17
1.2.2 Alteraciones moleculares en las vías de señalización relacionadas con <i>EGFR</i> en glioblastomas.....	18
1.3 Factores epigenéticos: microRNAs y regulación génica.....	23
1.3.1 MicroRNAs: Concepto, función y mecanismos de acción.....	23
1.3.2 Los microRNAs en el desarrollo neoplásico.....	25
1.3.3 MicroRNAs en el glioblastoma.....	31
1.3.4 Implicación de la familia de los miR-200 en la EMT.....	35
1.3.5 Utilización de la transfección en el estudio funcional de miRNAs.....	42
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	46
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	48
3.1 Estudio clínico de los pacientes.....	49
3.2 Caracterización de los tumores primitivos.....	49
3.2.1 Estudio histopatológico.....	50

3.2.2 Construcción de matrices tisulares (TMA).....	50
3.2.3 Estudio inmunohistoquímico	51
3.2.4 Estudios genéticos y epigenéticos	53
3.2.5 Extracción de proteínas y técnica de Western blot.....	74
3.2.6 Análisis estadístico	76
3.3 Generación de cultivos celulares para el estudio del comportamiento del miR-200c	78
3.3.1. Obtención y caracterización de los cultivos celulares	78
3.3.1.1 Estudio inmunocitoquímico	79
3.3.1.2 Estudio citogenético	81
3.3.1.3 Extracción de DNA de los cultivos celulares	83
3.3.1.4 Caracterización genética de los cultivos celulares por MLPA	83
3.3.2 Transfección en células tumorales de los cultivos celulares de glioblastomas: Inhibición de miR-200c, sobreexpresión de miR-200c y silenciamiento de EGFR.....	84
3.3.3 Estudios de viabilidad celular.....	86
3.3.4 Extracción y aislamiento de RNA y miRNA de los cultivos transfectados.....	88
3.3.5 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real.....	89
3.3.6 Extracción de proteínas de cultivos celulares y técnica western blot.	90
3.3.7 Estudios de migración celular	90
4. RESULTADOS	92
4.1 Estudio clínico.....	92
4.2 Estudio neuropatológico e inmunohistoquímico	94
4.3 Estudios genéticos y epigenéticos.	100
4.3.1 Amplificación de <i>EGFR</i>	101
4.3.1.1 Estatus del <i>EGFR</i> mediante PCR diferencial	104

4.3.1.2 Amplificación de <i>EGFR</i> por FISH relacionada con la expresión inmunohistoquímica de la proteína EGFR	105
4.3.1.3 Parámetros clínicos e histopatológicos en los diferentes grupos de amplificación de <i>EGFR</i>	106
4.3.2 Resultados del estudio genético y de metilación obtenidos con el análisis por MLPA y MS-MLPA	109
4.3.3 Estudios de secuenciación de <i>IDH1/IDH2</i> y <i>TP53</i>	132
4.4 Estudio de la expresión de miRNAs.....	133
4.4.1 Estudio del miR-200c y la expresión de mRNA de CDH1 y ZEB1 en relación a la amplificación de <i>EGFR</i>	138
4.4.2 Análisis de la expresión proteica de EGFR, CDH1, y ZEB1	140
4.5 Modelo experimental: Generación de cultivos celulares para el estudio del comportamiento del miR-200c	143
4.5.1 Caracterización de los cultivos celulares.....	144
4.5.2 Estudios de transfección en los cultivos celulares.....	152
4.5.3 Análisis de la expresión del mRNA de EGFR, CDH1 y ZEB1 en los cultivos celulares transfectados	160
4.5.3.3 Estudio de la expresión de proteínas en cultivos transfectados.....	166
4.5.4 Estudio de la migración celular en las diferentes situaciones	169
4.5.4.1 Estudio de Viabilidad celular	169
4.5.4.2 Estudio de la migración celular	171
5. DISCUSIÓN.....	181
5.1 Caracterización clínica, histopatológica e inmunohistoquímica	180
5.2 Caracterización genética. Amplif. de <i>EGFR</i> y vías de señalización	184
5.3 Estudio de la expresión de miRNAs en GB	193
5.4 Análisis del papel del miR-200c en el glioblastoma	199
6. CONCLUSIONES.....	213
7. BIBLIOGRAFÍA.....	217
8. APÉNDICE DOCUMENTAL	261

Listado de Figuras

Figura 1. Localización del gen Her-1 que codifica para el receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*), situado en el cromosoma 7, en la región 7p12.

Figura 2. Estructura esquemática del monómero de EGFR.

Figura 3. Esquema del proceso de dimerización del receptor EGFR.

Figura 4. Modelos de amplificación de *EGFR* en glioblastomas.

Figura 5. Diferencias entre la variante normal y la variante mutada de *EGFR*.

Figura 6. Esquema de las vías de señalización más importantes en GBs.

Figura 7. Alteraciones moleculares más frecuentes implicadas en el GB.

Figura 8. Esquema del funcionamiento del miRNA como supresor tumoral u oncogén.

Figura 9. Niveles en los que se plantea la posible interacción terapéutica sobre los miRNAs.

Figura 10. Esquema que muestra la interacción de miRNAs con las vías RTK/RAS/PI3K p53 y RB en Glioblastoma.

Figura 11. Presentación esquemática de la transición epitelio - mesenquimal (EMT).

Figura 12. Papel del miR-200 y ZEB1 en la EMT y en la progresión tumoral.

Figura 13. miRNAs implicados en el MMMI en glioma.

Figura 14. Construcción de las matrices tisulares.

Figura 15. Etapas de la Hibridación in situ de fluorescencia (FISH).

Figura 16. Etapas de la MLPA.

Figura 17. GeneChip® miRNA 1.0 Array.

Figura 18. Esquema del ensayo de viabilidad celular.

Figura 19. Esquema representativo del ensayo de migración celular.

Figura 20. Características histológicas generales del glioblastoma.

Figura 21. Patrones de infiltración en el glioblastoma con técnicas de H-E.

Figura 22. Expresión inmunohistoquímica en los GB.

Figura 23. Amplificación de *EGFR* analizado por FISH.

Figura 24. PCR diferencial en GB.

Figura 25. Análisis comparativo entre la amplificación de *EGFR* por FISH y la expresión de la proteína EGFR detectada por inmunohistoquímica.

Figura 26. Secuenciación de *TP53*.

Figura 27. Análisis de la expresión de miRNAs mediante microarrays.

Figura 28. Análisis por qRT-PCR de la expresión de EGFR, miR-200c, CDH1 y ZEB1 en 30 GB.

Figura 29. Expresión de las proteínas EGFR y E-caderina (CDH1) en casos que pertenecen a los tres grupos de estudio.

Figura 30. Morfología de las células de GB en cultivo.

Figura 31. Expresión inmunohistoquímica del cultivo celular HC-466.

Figura 32. Estado de *EGFR* observado en núcleos interfásicos y metafases.

Figura 33. Secuenciación de *TP53*.

Figura 34. Distribución de la población de células vivas. Relación del número de células vivas con su diámetro en los cultivos celulares estudiados.

Figura 35. Detección de micoplasmas en cultivos celulares.

Figura 36. Transfección de células de GB en cultivo de la línea U118.

Figura 37. Inhibición del miR-200c en los cultivos celulares de GB.

Figura 38. Sobreexpresión del miR-200c en los cultivos celulares de GB.

Figura 39. Representación gráfica de datos de qRT-PCR.

Figura 40. Silenciamiento de EGFR en los cultivos celulares de GB.

Figura 41. Transfección de células del cultivo HC-444, para lograr el silenciamiento de EGFR.

Figura 42. Análisis por qRT-PCR de la expresión de EGFR, miR-200c, CDH1 y ZEB1 en los cultivos celulares sin transfectar.

Figura 43. Análisis por qRT-PCR de la expresión de EGFR y ZEB1 en cultivos celulares transfectados.

Figura 44. Expresión de proteínas en los cultivos U-118, HC-444, HC-534 y HC-466.

Figura 45. Estudio de viabilidad celular por luminiscencia, medida por la producción de ATP de cada célula.

Figura 46. Análisis de las imágenes de migración celular de la línea U118, mediante el programa de morfometría Image Pro Plus 6.0.

Figura 47. Cuantificación del área de migración celular.

Figura 48. Modelo experimental en cultivos celulares.

Listado de Tablas

- Tabla 1.** Clasificación molecular de los gliomas malignos según la TCGA.
- Tabla 2.** Bases de datos y fuentes para la predicción de diana de miRNAs.
- Tabla 3.** Ejemplos más relevantes de miRNAs involucrados en cáncer.
- Tabla 4.** miRNAs que identifican los cinco subgrupos de glioblastoma relacionados con los precursores neurales.
- Tabla 5.** Anticuerpos utilizados en inmunohitoquímica.
- Tabla 6.** Reactivos utilizados en la PCR diferencial.
- Tabla 7.** Cebadores utilizados para la secuenciación de *IDH1* y de *IDH2*.
- Tabla 8.** Cebadores utilizados para secuenciar el gen *TP53*
- Tabla 9.** Componentes de la PCR.
- Tabla 10.** Componentes de la reacción BIG DYE.
- Tabla 11.** Componentes de la qRT-PCR.
- Tabla 12.** Componentes de la qRT-PCR.
- Tabla 13.** Componentes de la RT de miRNAs.
- Tabla 14.** Sondas utilizadas para la qRT-PCR.
- Tabla 15.** Anticuerpos utilizados en el western blot.
- Tabla 16.** Anticuerpos utilizados en el estudio inmunocitoquímico
- Tabla 17.** miRNAs utilizados en la transfección.
- Tabla 18.** Componentes de la PCR.
- Tabla 19.** Componentes de la qRT-PCR de miRNAs.
- Tabla 20.** Estudio clínico de los 46 casos de glioblastoma.
- Tabla 21.** Estudio de los patrones de infiltración y de los marcadores inmunohistoquímicos en GB.
- Tabla 22.** Estudio de *EGFR/CEP-7* por FISH.
- Tabla 23.** Genes del MLPA probemix P105-D1 Glioma-2 Salsa MLPA KIT
- Tabla 24.** Análisis del número de copias en los exones de *EGFR* por MLPA en los tres grupos del estatus de amplificación de *EGFR*.
- Tabla 25.** VNC en los genes del kit MLPA probemix P105-D1 Glioma-2
- Tabla 26.** VNC de los genes de referencia del kit MLPA probemix P105-D1 Glioma-2.
- Tabla 27.** VCN en los genes del kit ME001-C2 Tumor suppressor -1.
- Tabla 28.** VNC en los genes referencia del kit ME001-C2 Tumor suppressor-1.

Tabla 29. Porcentajes de alteraciones de los distintos genes del kit MLPA probemix P105-D1 Glioma-2, en los tres grupos de amplificación de *EGFR*.

Tabla 30. Porcentaje de alteraciones de los genes de referencia del kit MLPA probemix P105-D1 Glioma-2, en los tres grupos de amplificación de *EGFR*.

Tabla 31. Porcentaje de alteraciones de los genes del kit ME001-C2 Tumor suppressor-1, en los tres grupos de amplificación de *EGFR*.

Tabla 32. Porcentajes de alteraciones de los genes de referencia del kit ME001-C2 Tumor suppressor-1, en los tres grupos de amplificación de *EGFR*.

Tabla 33. Genes implicados en el 40% o más de los casos en los tres grupos según el estatus del *EGFR*.

Tabla 34. Genes implicados en el 30% o más de los casos en los tres grupos según el estatus del *EGFR*.

Tabla 35. Porcentaje de casos con un gen alterado en los tres grupos de *EGFR* en las tres vías de señalización.

Tabla 36. Porcentaje de casos en los tres grupos de *EGFR* con dos genes alterados en las tres vías de señalización.

Tabla 37. Estado de metilación (hipermetilación en porcentajes) en genes supresores de tumores del kit ME001-C2 Tumor suppressor-1, en los tres grupos de amplificación de *EGFR*.

Tabla 38. Hipermetilación de genes supresores del kit ME001-C2 Tumor suppressor-1. **M:** Hipermetilado.

Tabla 39. miRNAs expresados diferencialmente entre los grupos H-amp y N-amp ordenados por el valor de $p \leq 0,05$ de significación estadística.

Tabla 40. Función de los miRNAs significativos comunes a los grupos de estudio.

Tabla 41. Cuadro comparativo de intensidades absolutas de los perfiles de expresión de los miRNAs significativos en los casos de GB.

Tabla 42. Cuantificación de la expresión por western blot para *EGFR* y *CDH1* y expresión inmunohistoquímica de la proteína *ZEB1*.

Tabla 43. Identificación del cultivo celular correspondiente al tumor primario del que proceden.

Tabla 44. Resultados inmunocitoquímicos de los cultivos celulares de GB.

Tabla 45. Resultados de los cariotipos de los cultivos celulares.

Tabla 46. Estudio de *EGFR/CEP-7* por FISH.

- Tabla 47.** Variación del número de copias en los exones del gen *EGFR*.
- Tabla 48.** Resultados de la viabilidad celular inicial.
- Tabla 49.** Expresión de *EGFR* y *ZEB1* en los cultivos estudiados en las diferentes situaciones de transfección.
- Tabla 50.** Expresión de la proteína *EGFR* en las diferentes situaciones.
- Tabla 51.** Expresión de la proteína *ZEB1* en las diferentes situaciones.
- Tabla 52.** Área de migración en porcentajes de los diferentes cultivos celulares a las seis horas.
- Tabla 53.** Área de migración en porcentajes de los diferentes cultivos celulares a las 18 horas.
- Tabla 54.** Área de migración en porcentajes de los diferentes cultivos celulares a las 24 horas.
- Tabla 55.** Área de migración en porcentajes de los diferentes cultivos con inhibición de miR-200c.
- Tabla 56.** Área de migración en porcentajes de los diferentes cultivos con sobreexpresión de miR-200c.
- Tabla 57.** Área de migración en porcentajes de los diferentes cultivos con silenciamiento de *EGFR*.
- Tabla 58.** Genes implicados en los grupos del glioblastoma según el nivel de amplificación de *EGFR*.

ABREVIATURAS

ACTB. β - actina

AMP. Amplificación

APC. Gen de la poliposis adenomatosa de colon

ATRX. Síndrome de Alfa Talasemia con Retraso Mental ligado a X

BCL2. Linfoma de células B

BCNU Bio-cloretil casmustina nitrosourea

BCRA1. Cáncer de mama tipo 1

BCRA2. Cáncer de mama tipo 2

BIM. Proteína proapoptótica semejante a Bcl-2

BSA. Albumina de suero bobino

CASP8. Caspasa 8

CASR. Receptor sensible al calcio

CC. Crisis comicial

Cc. Cuerpo calloso

CD27. Molécula que codifica al factor de necrosis tumoral

CDH1. Caderina 1

CDH13. Caderina 13

CDK4. Quinasa dependiente de ciclina 4

CDK6. Quinasa dependiente de ciclina 6

CDKN2A. Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 2A

CDKN2B. Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 2B

CHD7. Helicasa con cromodominio de union a DNA

CHFR. Punto de control con dominio "forkhead" y "ring finger"

CLL. Leucemia linfocítica crónica

Ct. Ciclo umbral

CTGF. Factor de crecimiento del tejido conectivo

CTNBI. β Catenina 1

DMSO. Dimetilsulfóxido

DN. Déficit neurológico

DQ. Dosage Quotient

Dr. Derecha

DSI. Duración del síntoma inicial

E3. Ubiquitina ligasa

EGF. Factor de crecimiento epidérmico
EGFR. Receptor del Factor de crecimiento epidérmico
EMT. Transición epitelio-mesenquimal
ErbB. Receptores tirosina quinasa
ESR1. Receptor de estrógeno 1
F. Femenino
F. Frontal
FC. Fold change
FHIT. Frágil tríada de histidina
FISH. Hibridación *in situ* de fluorescencia
GB. Glioblastoma
GFAP. Proteína fibrilar acídica de la glía
GICs. Células iniciadoras de Glioblastoma
GICs. Células madres neoplásicas de glioblastoma
H-amp: Alto nivel de amplificación
HIC1. Hipermetilado en cáncer 1
HIRIP3. Proteína 3 que interactúa con HIRA
HMGB1. Proteína de alta movilidad grupo 1
HMZ. Deleción en homocigosis
HMZ-p. Deleción en homocigosis parcial
HSR. Regiones cromosómicas homogéneamente teñidas
HTIC. Hipertensión intracraneal
IDH. Isocitrato deshidrogenasa
IFN. Interferón
IK: Índice de Karnofsky
IL4. Interleucina 4
INK4A-ARF. Factor de ADP-ribosilación *Locus* multifuncional supresor de tumores
Iz. Izquierda
JM. Dominio yuxtamembranal
Ki-67. Anticuerpo de proliferación celular
KLK3. Calicreína peptidasa 3
L-amp: Bajo nivel de amplificación
LARGE. Xilosil- glucuroniltransferasa
LOH: Deleción en heterocigosis
LOH-p. Deleción en heterocigosis parcial

M. Masculino

MDM2. dobles minutos murina 2

MIB-1. Anticuerpo monoclonal murino

MIG6. Gen mitógeno inducible 6

MIR26A2. MicroRNA26a2

MLH1. Homólogo 1 de MutL

MLH3. Homólogo 3 de MutL

MMMI Modo Mesenquimal de Migración e Invasión

MYBPC3. proteína C de unión a la miosina cardiaca.

MYO5B. Miosina Vb

N-amp. No amplificación

NF1. Neurofibromatosis-1

NFKBIA. Factor nuclear kappa B, subunidad 1

no UNG. No contiene Uracil N-glucosilasa.

NOS. De origen desconocido

nv. No valorable

O. Occipital

OCA2. Codifica para una proteína transmembrana melanosomal 2

OMS. Organización Mundial de la Salud

onco-miRs. miRNA que actúa como oncogén.

P. Parietal

P. Polisomías

p53. Proteína 53

PAH. Fenilalanina hidroxilasa

PARK2. Proteína 2 del Parkinson, E3 Ubiquitin Proteina Ligasa.

PBS. Tampón fosfato salino

PCR. Reacción en cadena de la polimerasa

PDGFR. Receptor del Factor de crecimiento derivado de plaquetas.

PDGFRA. Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, polipéptido alfa

PI3K. Fosfatidilinositol 3-quinasa

PKHD1. Gen de la enfermedad renal poliquística 1

PLS-DA: Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales

PTEN. Fosfatidilinositol-3,4, 5-trisfosfato 3-fosfatasa

PTK9. Proteína tirosina quinasa 9

QT (BCNU). Quimioterapia por carmustina

QT-T. Quimioterapia -Temozolomida
RAB7A. Miembro de la familia de oncogenes RAS
RARB. Receptor β del ácido retinoico
RASSF1. Miembro 1 de la familia de asociación de dominios Ras.
RIN. Valor de integridad del RNA
RMN. Resonancia Magnética Nuclear
ROCK1. Proteína quinasa 1 que contiene una hélice super enrollada a Ro
RT Radioterapia
RT. Transcripción reversa
RTK. Receptores tirosina quinasa
RYBP. Proteína de unión a RING1 y a YY1
SAMHD1. Dominios SAM y HD que contiene Trifosfato de deoxinucleósido 1
FBS. Suero bovino fetal
SCN1A. Canal de sodio neuronal, subunidad 1
SNC. Sistema Nervioso Central
STAT. Transductor de señal y activador de la transcripción
T. Trisomías del cromosoma 7
T. Temporal
TAC. Tomografía axial computarizada
TBST . Tampón salino Tris y Tween
TCGA. Atlas Genómico del cáncer
TERT. Gen de la telomerasa transcriptasa reversa.
TGF- α . Factor de crecimiento transformante alfa.
TIMP3. Inhibidor 3 de la metalopeptidasa
TKIs. Inhibidores tirosina-quinasa
TP73. Proteína tumoral 73
TSC2. Complejo de esclerosis tuberosa 2
TS-miRs. Micro-RNAs que actúan como genes supresores tumorales
VHL. Von Hippel Lindau

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Tumores gliales: Glioblastoma

El glioblastoma (GB) es el tumor primario más común entre las neoplasias gliales, constituyendo una de las entidades neoplásicas malignas más agresivas del organismo, con una supervivencia media de 12 meses ¹⁹⁰. Es por esta razón que la investigación sobre su comportamiento y los posibles tratamientos han venido en ascenso en los últimos años.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2000, posteriormente en el 2007 ¹⁹⁰ y finalmente en el 2016 ¹⁹¹ definieron el glioblastoma como un tumor glial astrocítico junto con otras neoplasias gliales astrocitarias del Sistema Nervioso Central (SNC).

Los glioblastomas primarios (astrocitoma grado IV) son neoplasias que aparecen por primera vez en un paciente sin antecedentes previos de astrocitoma, y son la variante más frecuente de estos tumores; por otra parte, los glioblastomas secundarios pueden originarse de un astrocitoma difuso (grado II), o de un astrocitoma anaplásico (grado III) ²²¹. En la última clasificación de la OMS (2016), identifican el glioblastoma primario con el glioblastoma IDH negativo ¹⁹¹.

Estos subtipos de glioblastoma se desarrollan a través de diferentes vías genéticas, mostrando perfiles de expresión génica propios y pueden diferir en su respuesta a la radioterapia y a la quimioterapia.

1.1.1 Aspectos clínicos

Epidemiología e incidencia

Su incidencia en los países de Europa y América del Norte oscila entre 3 y 4 casos por 100000 habitantes por año ¹⁹⁰. Puede manifestarse a cualquier edad, pero aparece con más frecuencia entre la quinta y la séptima década de la vida. Se ha visto una prevalencia de este tumor en el sexo masculino con respecto al femenino en una ratio que oscila 1,26-1,5 con dependencia del país ¹⁹⁰.

Se presenta en los hemisferios cerebrales, siendo menos frecuente su localización en el tronco del encéfalo o la médula espinal. Al igual que todos los tumores cerebrales, excepto en casos muy raros, no se expande más allá de las estructuras del Sistema Nervioso Central ¹⁹⁰.

La aparición de estos tumores es habitual en la región anterior del cerebro, especialmente en la sustancia blanca subcortical de los hemisferios cerebrales. La localización más frecuente es en los lóbulos frontales (40%), seguida de los lóbulos temporales (31%), y parietales (24%). Sin embargo, los lóbulos occipitales (16%) son una localización muy poco común ^{26,190}.

Factores de riesgo y evolución

La etiología del GB es compleja de explicar, actualmente no se conocen con exactitud las causas reales que lo provocan. Análisis epidemiológicos señalan que en su desarrollo se asocian factores ambientales y de exposición a carcinógenos. Los factores de riesgo evaluados que pueden estar implicados en la formación del GB son: radiaciones ionizantes, no ionizantes, exposición a compuestos químicos, a virus, exposición a sustancias carcinógenas, presencia de mutaciones y factores hereditarios ^{81, 248}.

Con frecuencia el tumor crece hasta alcanzar un gran tamaño y volumen sin haber dado ningún signo o síntoma de su presencia, frustrando así los intentos de un diagnóstico o terapia temprana.

Los síntomas son derivados de la localización, del crecimiento directo del tumor, de la compresión local y del aumento de la presión intracraneal ¹⁵⁴. Los principales síntomas son cefalea, náuseas, vómitos, dilatación de los vasos cerebrales con alteraciones de la retina, hemiparesia, hemianestesia, hemianopsia, diplopía, afasia y crisis convulsivas, los cuales, son similares a los de una masa expansiva en el interior del cráneo, que aumenta la presión intracraneal ¹⁹⁰. Las crisis comiciales se presentan como un síntoma general. Aproximadamente un tercio de los GB se diagnostican después de una crisis comicial, la cual puede dar información sobre la localización del tumor ¹⁹⁰.

Patrones radiológicos

La presencia de un tumor cerebral se detecta con eficacia a través de la tomografía computarizada (TAC) y la resonancia magnética (RM).

La heterogeneidad radiológica se debe a que suele ir acompañado de lesiones hiperintensas, hemorragias, y calcificaciones que le confieren un aspecto muy dispar. Las masas tumorales están pobremente delimitadas,

exhiben áreas necróticas y formación de áreas sólidas que ocasionan señales mixtas. Todo ello es la expresión de un rápido crecimiento y por lo tanto de una elevada malignidad ²⁶.

La utilidad de ambas técnicas es para poder determinar la extensión del tumor, número de lesiones, tamaño y zonas afectadas; así como posibles complicaciones secundarias al tumor.

Tratamiento

El glioblastoma es una neoplasia que responde mal a los diferentes modelos de acción terapéutica. Ello se debe a diferentes factores entre los que destaca la resistencia de las células tumorales a los tratamientos convencionales, a la susceptibilidad del tejido nervioso a la acción terapéutica, a la existencia de barrera hematoencefálica que limita la acción quimioterápica.

En general se plantean dos patrones de acción terapéutica, el tratamiento de apoyo y el tratamiento curativo. El tratamiento de apoyo tiene como objetivo paliar los síntomas y mejorar las funciones neurológicas del paciente ³¹⁵, mientras que el tratamiento curativo comprende la cirugía total, la radioterapia y la quimioterapia. El carácter infiltrante del tumor y la proximidad de áreas funcionalmente importantes hace que la cirugía tenga una efectividad parcial; reduce la masa tumoral, permite un alivio de los síntomas, y facilita las terapias coadyuvantes mejorando ligeramente la supervivencia ^{17,115}.

La radioterapia mejora sustancialmente la evolución. Se suele administrar de 58-60 Gy abarcando el lecho del tumor y unos 2,5 cm aproximadamente de margen. Los casos de curación completa por radioterapia son muy raros ²²⁹.

La quimioterapia estándar se basa en el uso de agentes alquilantes, aunque en los últimos años se han incrementado los ensayos y estudios combinados con fármacos dirigidos contra dianas moleculares específicas.

Los agentes quimioterapéuticos más usados son las nitrosureas principalmente BCNU (Carmustine bis-chloroethyl nitroso urea) y la temozolomida, este último es un fármaco alquilante con bajo efecto tóxico que mejora la penetración en el SNC respecto a otros fármacos ^{268,326}.

Otras acciones terapéuticas como la quimioterapia local consisten en la implantación en la masa tumoral, tabletas de polímeros impregnadas con

carmustina (Gliadel), permitiendo aumentar la supervivencia en 2-3 meses¹⁷⁶.

La búsqueda de nuevos agentes antineoplásicos, de nuevas modalidades quirúrgica, de nuevas biomoléculas, así como los ensayos de inmunoterapia son las estrategias terapéuticas que se deben estudiar e implantar para mejorar la supervivencia de los pacientes.

1.1.2 Neuropatología

El glioblastoma es una neoplasia neuroectodérmica de rápido crecimiento, con una población heterogénea de células tumorales astrocitarias pobremente diferenciadas con pleomorfismo, necrosis, proliferación vascular y actividad mitótica.

Descripción macroscópica

Se presenta preferentemente como una lesión unilateral, pero en ocasiones se puede encontrar con una apariencia multifocal con localizaciones distantes²³. Los glioblastomas en los hemisferios cerebrales suelen ser intraparenquimales con aparente origen en la sustancia blanca.

Las masas tumorales son de color grisáceo, junto con otras de color amarillo y marrón, estas variaciones de color se corresponden con las zonas necróticas y hemorrágicas y con el patrón morfológico heterogéneo del tumor. La consistencia es variable, sólida en las áreas periféricas y blandas en las centrales²⁶. En ocasiones son sorprendentemente grandes en el momento de la presentación, ocupando un gran volumen del lóbulo afectado¹⁵⁴.

Los patrones de infiltración de estas lesiones son meningeales, subependimales e intraventriculares, utilizan con frecuencia los tractos de fibras (cuerpo calloso) para su difusión, sin embargo, no hay una vía definida de expansión. A pesar de la elevada agresividad, los GBs casi nunca tienen metástasis aunque se han publicado algunos casos excepcionales^{8, 31, 104, 247}.

Descripción microscópica

Microscópicamente, el glioblastoma se define por su alta heterogeneidad. Los criterios morfológicos en estos tumores son: ser un tumor anaplásico con diferentes poblaciones celulares, acompañadas de proliferación vascular con formaciones glomerulares, y presencia de necrosis extensa^{37,236}.

Según la capacidad infiltrante de los glioblastomas, pueden desarrollar un patrón nodular o difuso. El patrón nodular está definido por un cambio brusco, significativo entre la densidad celular del tumor y el límite periférico de tejido nervioso. El patrón difuso se caracteriza porque la densidad celular decrece progresivamente, no diferenciándose un límite claro entre el tumor y el tejido nervioso, va infiltrando poco a poco llegando a ocupar grandes áreas del tejido nervioso sin un borde definido. Aunque la infiltración de células neoplásicas es observable, el patrón de infiltración difusa limita la capacidad de resección quirúrgica por la extensión de las células neoplásicas a distancia^{5, 57, 250, 335}.

Dos de los criterios diagnósticos fundamentales en el glioblastoma además del componente celular son la hiperplasia vascular y la necrosis.

La proliferación microvascular es una característica propia del GB. El crecimiento displásico de los vasos, la formación de redes con patrón pseudoglomerular, la proliferación endotelial y de las células periféricas a los vasos, definen estas estructuras que aparecen en el tumor.

La necrosis es igualmente un criterio diagnóstico. Se presenta en forma de extensas áreas asociadas a haces vasculares trombosados, o bien a necrosis de poca extensión (micro necrosis) o mostrando patrones serpenteantes^{233,234}. Como consecuencia de todas estas alteraciones vasculares se producen amplias regiones de necrosis.

Patrones histológicos

La celularidad característica de los glioblastomas es muy heterogénea en cuanto a su composición y al grado de diferenciación. Una parte de la población neoplásica mantiene patrones celulares astrocitarios, y junto a ella se presentan diferentes tipos celulares: células pobremente diferenciadas, fusiformes, redondas o pleomórficas y, ocasionalmente,

células gigantes multinucleadas, células pequeñas indiferenciadas, gemistocitos, células oligo-like, células lipidizadas y granulares ¹¹⁷.

Los diferentes tipos celulares pueden aparecer de forma pura en algunos casos, pero normalmente son variables en su predominio. La mayoría de casos muestran predominio de células estrelladas, irregulares o fusiformes. Estas células tienen núcleo ovalado hipercromático, con nucleolo visible y un citoplasma bipolar. Se disponen continuamente a lo largo de toda la lesión o en grupos sin forma definida. También infiltran difusamente la sustancia blanca y las mitosis son frecuentes y normales ^{37,117}.

El glioblastoma de célula pequeña no es considerado una variante, sino un patrón morfológico celular predominante. Este patrón se identifica microscópicamente cuando hay una población monomórfica de células pequeñas exclusiva o predominante, fusiforme, densamente empaquetada con núcleos hipercromáticos. La proliferación vascular, la necrosis y la inmunoreactividad frente a GFAP pueden ser bajas, mientras que se observa una marcada actividad proliferativa ^{26,154, 230}.

El glioblastoma con componente oligodendroglial o también conocido como “oligo-like”, presenta un patrón morfológico con diferenciación oligodendroglial. Microscópicamente las células oligo-like presentan núcleos hipercromáticos redondeados, asociados con halos perinucleares y escasas proyecciones citoplasmáticas. Las áreas de diferenciación oligodendroglial son variables en tamaño y frecuencia. Pueden aparecer en distribución compacta o de modo difuso que es más frecuente. La presencia de un componente oligodendroglial dentro de un glioblastoma se considera un factor pronóstico más favorable; uno de cada cinco pacientes con un 30% o menos de células “oligo-like” sobrevive períodos de 1-2 años con un tratamiento quimioterápico ^{154,302, 307}.

En el otro extremo de diferenciación están los gemistocitos y astrocitos fibrilares. Los gemistocitos tienen un citoplasma abundante, no fibrilar. El núcleo es oscuro y desplazado hacia la periferia de la célula ³⁷.

1.1.3 Variantes dentro del GB

Los gliosarcomas son una variante poco frecuente del glioblastoma (aproximadamente el 2%), y se caracteriza por presentar un componente glial y otro sarcomatoso¹⁶. A nivel macroscópico es un tumor que está delimitado. Presenta mucho tejido conectivo que le confiere un aspecto más encapsulado, aunque puede diseminarse infiltrando los tejidos próximos¹⁹⁰.

Los glioblastoma de células gigantes son una variante poco frecuente que constituye el 1% de los tumores cerebrales y el 5% de los glioblastomas. Microscópicamente presenta una prevalencia de células bizarras, gigantescas (hasta 400 µm de diámetro) y multinucleadas (más de 20 núcleos)¹⁹⁰. También aparecen pequeñas células sincitiales, fusiformes y presenta una alta frecuencia de mutaciones en el gen *TP53*¹⁵⁴. Esta variante se ha considerado de mejor evolución que el glioblastoma habitual debido a que se encuentra mejor delimitada, y por sus aparentes características no infiltrantes¹⁵⁴.

Recientemente, la OMS en 2016¹⁹¹, ha clasificado los GB en glioblastoma *IDH* no mutado, glioblastoma *IDH* mutado y glioblastoma NOS de origen desconocido. El GB *IDH* no mutado se corresponde con mayor frecuencia con el GB primario definido clínicamente, presente en el 90% de los casos de GB y predominante generalmente en pacientes de más de 55 años de edad²¹⁹. Por su parte, el GB *IDH* mutado se corresponde estrechamente con el GB secundario y surge preferentemente en los pacientes más jóvenes²¹⁹, representando aproximadamente el 10% de los casos.

El GB NOS, es una clasificación diagnóstica que se reserva para aquellos tumores en los que no se puede completar o realizar la evaluación del *IDH*.

Dentro del GB *IDH* no mutado se agrupan las variantes de GB ya conocidas de gliosarcoma y glioblastoma de célula gigante¹⁹⁰, y nueva variante provisional de glioblastoma en esta nueva clasificación: el glioblastoma epiteliode. Esta variante presenta grandes células epitelioides con abundante citoplasma eosinófilo, cromatina vesicular y nucleolos prominentes. Se presenta como masas cerebrales superficiales, y es más común en niños y adultos jóvenes¹⁹¹.

1.1.4 Características inmunohistoquímicas

El GB es considerado una neoplasia astrocítica que expresa como elemento diferencial la proteína gliofibrilar ácida (GFAP). GFAP es una proteína antigénica, que está involucrada en el mantenimiento de la forma, movimiento y función de las células astrogliales ¹⁹⁰. En el GB las células conservan cierta diferenciación astrocítica y son fuertemente positivas, cabe destacar la notable tinción en los gemistocitos. Las células gigantes multinucleadas son las más variables en su expresión de GFAP ¹⁵⁴.

Cabe destacar, que la proporción de células reactivas que expresan GFAP varía debido a la elevada heterogeneidad celular del GB. La intensidad de la expresión de GFAP es altamente variable. Dentro de un tumor puede haber regiones sin expresión, como por ejemplo regiones con alto contenido de células pequeñas anaplásicas. Hay una tendencia a la ausencia de expresión conforme el tumor va progresando, pero no se considera que tenga un valor pronóstico ¹⁹⁰.

Las células de este tumor expresan también el antígeno Ki-67 que se define por su reactividad con el anticuerpo monoclonal murino MIB-1. Es considerado un marcador de la proliferación de células neoplásicas. Esta proteína Ki-67 se expresa predominantemente durante todas las fases activas del ciclo celular (G1, S, G2 y M), estando ausente en las células quiescentes (G0). El antígeno se detecta exclusivamente en el núcleo en interfase, y los índices de expresión en el GB son elevados ¹⁴⁸. El antígeno Ki-67 muestra una correlación directa con el incremento del grado histológico en los gliomas. Los estudios utilizando este marcador en glioblastomas no han sido concluyentes para establecer un factor pronóstico o predictivo de supervivencia, debido probablemente a la presencia de áreas heterogéneas con diferente curso proliferativo dentro del tumor ³⁷.

La proteína p53 actúa como un supresor tumoral, y aparece alterada en la mayor parte de las neoplasias. La proteína p53 funciona, al menos en parte, como un factor de transcripción que controla la expresión de los genes diana que median la detención del ciclo celular, reparación del ADN, y apoptosis ²². La inactivación mutacional del gen de *TP53* y la presencia de la

expresión de p53 aberrante aparecen en el GB, lo que sugiere que p53 tiene un papel en la progresión tumoral ^{210, 243}.

La sobreexpresión del receptor de membrana EGFR se detecta en más del 60% de los GBs, siendo poco frecuente en GBs secundarios y en otras neoplasias astrocíticas. Este gen codifica para una proteína de 170KDa, la cual es la responsable de la unión a ligandos extracelulares como EGF y TGF- α , y para las señales de trasducción y proliferación ^{72,190}. Un estudio ampliado del EGFR se describe en el apartado 1.2.1.

1.2 Características genéticas: del estudio citogenético al estudio molecular

Existen diferentes factores genéticos implicados en el desarrollo de los glioblastomas, identificándose múltiples alteraciones en genes que controlan directamente la proliferación y muerte celular. A pesar de los estudios citogenéticos y moleculares realizados, no existe todavía un patrón genético único que tipifique a este tumor.

Los estudios citogenéticos, muestran diferentes anomalías numéricas y estructurales en estos tumores. En el grupo de las anomalías numéricas, las más frecuentes son la ganancia del cromosoma 7 en el 42% de los casos, la pérdida del cromosoma 10 en el 35,2% y la pérdida de cromosomas sexuales. Entre las anomalías estructurales cabe destacar las reordenaciones en 9p y la presencia de dobles minutos ^{21,27,196,206}.

Durante el proceso carcinogénico del glioblastoma, sus células presentan alteraciones como amplificación génica o aneuploidía, las cuales son manifestaciones de inestabilidad genómica. Para detectar estos cambios se han utilizado técnicas como la hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH). Mediante sondas pericentroméricas que permiten la detección de aneuploidías a nivel tanto del núcleo interfásico como de los cromosomas, y mediante el uso de sondas específicas para detectar otras alteraciones cromosómicas.

Son varios los autores que han utilizado una sonda centromérica del cromosoma 7 para comprobar la sobrerepresentación de este cromosoma. Esta ganancia se ha visto en porcentaje variables entre el 55%-83% según las

series analizadas ^{6,185,191}. Otro cromosoma estudiado ha sido el 10, debido a su frecuente pérdida en los estudios de citogenética convencional. Se ha observado una pérdida de este cromosoma en el 45% al 75% de los casos estudiados ^{6,185}.

En un intento de definir poblaciones o clones tumorales, mediante estudios de asociación entre estos dos cromosomas, se han estudiado series de GB con las dos sondas simultáneamente. Estos estudios de asociación han revelado la presencia de varios clones, siendo el más frecuente la asociación de la trisomía 7 con la monosomía 10, presente en el 35%-70% de los casos estudiados ^{185, 214}.

Las pérdidas de cromosomas sexuales son habituales en los cariotipos de GB. Este hecho se ha confirmado mediante FISH, observándose una pérdida del cromosoma Y en el 60%-70% de todos los GB de varones y pérdida del cromosoma X en el 55%-65% de GB en mujeres ²²⁸.

A nivel molecular, las alteraciones genéticas encontradas en las células tumorales se puedan agrupar de manera amplia en dos tipos según sean los tipos de genes reguladores que afecten: oncogenes y genes supresores ²⁴⁰.

En el GB los oncogenes como el *EGFR* (7p12), *PDGFR* (4q12), *MDM2* (12q13~q15), *CDK4* (12q13~q15), así como genes supresores de tumores como *TP53* (17p13), *INK4A-ARF* (9p21), *PTEN* (10q23.3) y *RBI* (13q14.2) son los que presentan más frecuentemente alteraciones genéticas ^{21,58, 93,114,294}.

A nivel mutacional, los estudios de secuenciación realizados hasta el momento, permiten estudiar las frecuencias de mutaciones somáticas puntuales, y significativas en el glioblastoma. Los genes más frecuentemente mutados son: *TP53* (31%-37%), *PTEN* (24%-33%), *NF1* (15%-17%), *EGFR* (14%-17%), *IDH1* (11%), *RBI* (8%-12%), *PIK3CA* (7%-10%), *ERBB1* (7%) ^{188, 227,279,280, 281}.

Recientemente se han detectado mutaciones en otros genes como el gen de la telomerasa transcriptasa reversa (*TERT*) que aparece en el 70%-80% de los casos, una subunidad del complejo telomerasa que su expresión está asociado a peor pronóstico en tumores cerebrales como el glioblastoma ^{5, 151, 260, 298}. En general, las mutaciones en *TERT* predicen peor pronóstico en pacientes sin mutaciones de *IDH1/2*, y a la vez las mutaciones del *TERT*

pueden estar asociadas a un pronóstico más favorable y larga supervivencia en pacientes con diagnóstico de gliomas que presentan la mutación de *IDH1/2* ^{5, 151, 165}.

Otro gen recientemente estudiado es el *ATRX*, las mutaciones del gen *ATRX* se han encontrado en diversos subtipos y grados de gliomas, y llevaron a perfilar el pronóstico de los gliomas malignos en combinación con el estado del *IDH* y del 1p/19q. Las mutaciones en *ATRX* están asociadas con la pérdida de la expresión de la proteína *ATRX* nuclear, convirtiéndolo en un biomarcador candidato prometedor para el pronóstico en el entorno neuropatológico ^{101, 147}.

Otras alteraciones encontradas en GBs son modificaciones epigenéticas, consideradas como cambios en la expresión génica que se originan por una modificación covalente en el DNA y/o cambios en las proteínas histonas. Durante la progresión de este tumor se ha visto inicialmente una pérdida progresiva del contenido de metilación global del DNA.

En GBs, la hipometilación afecta tanto a secuencias repetitivas como a un locus de copia única. En cuanto a la hipermetilación se ha visto que afecta a la región promotora de genes como *RBI*, *CDKN2A/B*, *PTEN* y *TP53* implicados en las rutas de señalización más importantes relacionadas con *EGFR*, y cuya función está implicada con la carcinogénesis y la progresión tumoral ^{19, 38, 74, 75}.

Dentro de este tipo de alteraciones, una de las más importantes es la metilación en el promotor de *MGMT* (Metilguanidina ADN Metiltransferasa), encontrándose en el 40 % de los glioblastomas primarios y con asociación a un silenciamiento postranscripcional en este gen. Se ha demostrado que la hipermetilación de *MGMT* puede ser un marcador predictivo de la respuesta a la quimioterapia alquilante en estos tumores ^{5, 29, 113, 313}.

De todas las alteraciones moleculares es **la amplificación de *EGFR*** la que está implicada más frecuentemente en GBs. Está presente en el 45%-70% de los casos de glioblastoma primario, considerándose como un marcador primario en la biopatología de este tumor ^{187, 220, 221}.

1.2.1 Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR): Características y papel en la biopatología del glioblastoma

El receptor del factor de crecimiento epidérmico EGFR es un receptor celular que pertenece a la familia de receptores tirosina quinasa ErbB y se caracteriza por presentar dos regiones ricas en residuos de cisteína en la parte extracelular de la molécula, y está codificado por el gen *c-erbB-1* o *Her-1*, situado en el cromosoma 7, en la región 7p12¹⁵⁵ (Figura 1).

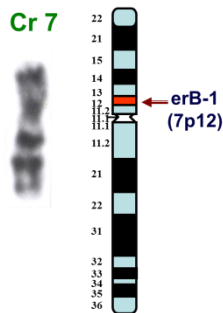


Figura 1. Localización del gen Her-1 que codifica para el receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*), situado en el cromosoma 7, en la región 7p12.

Los receptores de la familia de EGFR juegan un papel determinante en el desarrollo normal de la célula, la diferenciación, migración, reparación celular y apoptosis. Se ha demostrado que el incremento en la expresión o desregulación del receptor EGFR y/o en uno de sus ligandos principales, pueden provocar que éste se encuentre activado. Estas alteraciones representan una característica común de numerosos tumores humanos sólidos, incluidos el cáncer de pulmón, colorrectal, de ovario y del SNC. Además se ha encontrado una correlación de éste fenómeno con una patología más agresiva y un peor pronóstico^{67,223}.

1.2.1.1 Estructura y dimerización

EGFR es una glicoproteína de membrana que posee cuatro grandes dominios. Pueden existir diferencias sustanciales en la longitud y composición del dominio extracelular, pero básicamente se componen de un

sitio de unión al factor de crecimiento epidérmico EGF, y otra serie de subunidades que pueden estar presentes o ausentes, dependiendo de la subfamilia de ligando que se trate ⁴⁴. Posee un dominio extracelular formado por dos subdominios de unión a ligandos (L1 y L2) y dos dominios ricos en cisteína (S1 y S2), del que S1 permite la dimerización de EGFR con un segundo receptor ErbB. SH1 es la región con actividad tirosina-quinasa y reside en el citoplasma celular, posee seis residuos tirosina disponibles para transfosforilación. El dominio transmembrana y el dominio yuxtamembranal (JM) son necesarios para el anclaje a la membrana ²²³ (Figura 2).

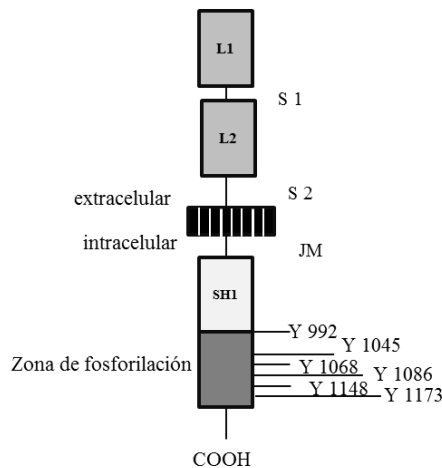


Figura 2. Estructura esquemática del monómero de EGFR.

La dimerización se consigue por la interacción del dominio S1 de la región extracelular con un ligando produciendo un complejo ligando-receptor. Para que un receptor tirosina-quinasa se active es necesario que se oligomerice. Este proceso puede ocurrir por varios supuestos, entre ellos por unión a ligandos, por incremento en la expresión del receptor, o por alteraciones moleculares que hacen que éste se encuentre muy activado ⁹⁰.

Los receptores de la familia ErbB son activados por dimerización. En ausencia de ligandos los receptores EGFR residen en la membrana de la célula de forma inactiva, distribuidos uniformemente por su superficie. Es necesario que ocurra la dimerización o la oligomerización del receptor para que presente actividad quinasa, desencadenando cascadas de señalización

intracelular que activan rutas como: PI3 Kinasa/ AKT, RAS/ MAP Kinasa, c-myc, protein kinase C y STAT. Todas estas vías conducen a la célula a activar la transcripción de genes específicos que inducen proliferación celular, resistencia a apoptosis, invasión tumoral y angiogénesis; en definitiva a una transformación neoplásica maligna^{169, 216,240}. Por tanto, el dominio intracelular del receptor transmite una señal extracelular hacia el núcleo de la célula a través de cascadas de fosforilación (Figura 3).

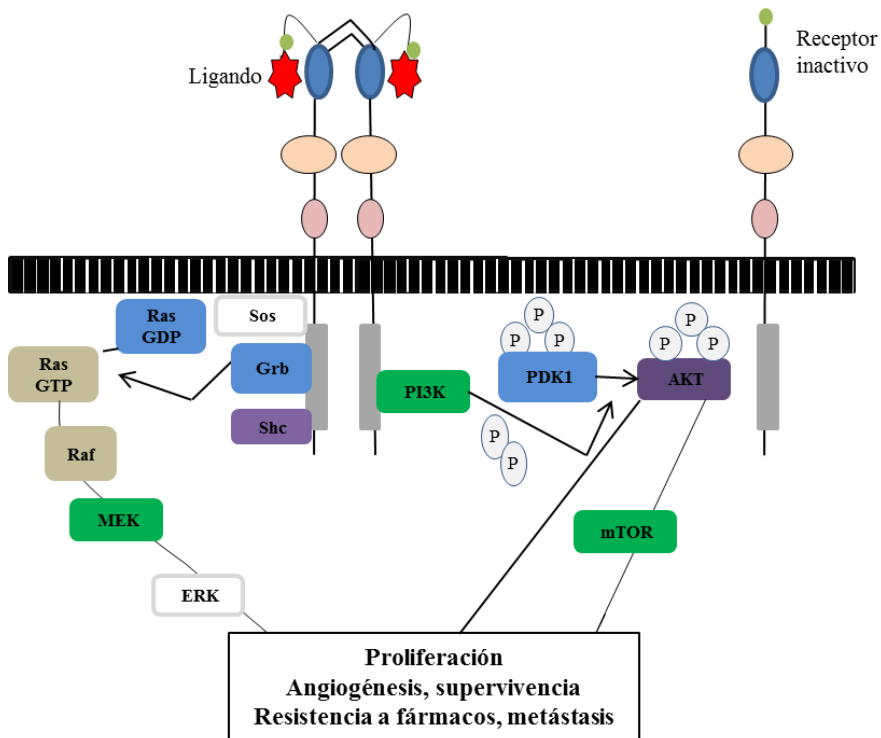


Figura 3. Esquema del proceso de dimerización del receptor EGFR.

1.2.1.2 Amplificación del *EGFR*

La amplificación del gen *EGFR* es la alteración más frecuentemente detectada en glioblastomas y a menudo se asocia con reagrupamientos génicos¹⁹¹. La amplificación génica suponen la duplicación de ciertas

regiones del DNA que conducen a la existencia de múltiples copias de un gen.

Diferentes autores han publicado la amplificación del *EGFR* en glioblastomas. El porcentaje de estos tumores con amplificación del *EGFR* se sitúa entre el 40-50% de los casos ^{123,138,240,264}. Sin embargo, algunos autores amplían este rango hasta el 73% ^{187,198}. Estas diferencias se han atribuido a las diferentes metodologías utilizadas (PCR, FISH, Southern-Blot).

A nivel citogenético la amplificación génica se puede presentar fundamentalmente de dos maneras: como copias extracromosómicas, llamados “dobles minutos” (dmin), o como copias repetidas en tandem o invertidas dentro de una región cromosómica; citológicamente estas últimas se visualizan como regiones cromosómicas homogéneamente teñidas (HSR). Estas dos formas son interconvertibles, y rara vez se presentan simultáneamente. Una tercera forma de amplificación observada preferentemente en líneas celulares es la inserción genómica, en la que las copias de un determinado gen se distribuyen en varias localizaciones en los cromosomas ^{4,163}.

Con los estudios de FISH y PCR se han podido identificar diferentes patrones y 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, con un gran número de copias del gen por núcleo, con expresión citogenética en forma de dmin; GBs con un bajo nivel de amplificación, con un pequeño número de copias por núcleo, un porcentaje pequeño de células afectadas y una expresión citogenética de inserciones en locus diferentes del cromosoma 7; y GBs sin amplificación de *EGFR* ^{186,187} (Figura 4). La amplificación de *EGFR* se ha observado asociada con el aumento en el número de copias del cromosoma 7 total o parcial, que como hemos comentado anteriormente, es la anomalía cariotípica más frecuente encontrada en el GB ^{185,186,240}.

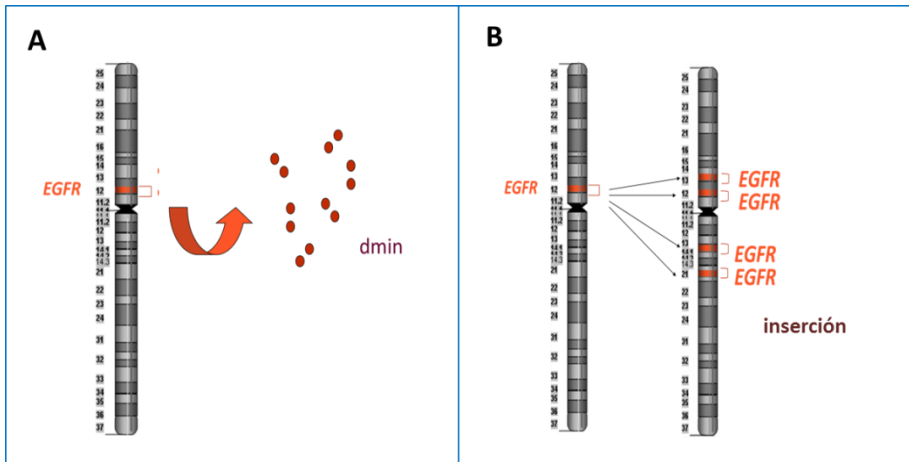


Figura 4. Modelos de amplificación de *EGFR* en glioblastomas. **A)** Amplificación génica en forma de dobles minutos. **B)** Amplificación génica en forma de inserciones en el cromosoma 7.

La mitad de los casos con amplificación de *EGFR* presenta también reordenamientos del gen, lo cual repercute en una considerable variedad de alteraciones cualitativas y estructurales del receptor, propiciadas por las diferentes mutaciones que puede sufrir el gen^{72,83,240,255}. La aparición de la delección *EGFRvIII* es la alteración más frecuente, afectando al 67% de los GBs con *EGFR* amplificado^{83, 174, 280, 281}. Esta delección se caracteriza por la pérdida de los exones del 2-7 que codifican para los aminoácidos del dominio extracelular^{72, 271}. *EGFRvIII* codifica para un receptor con un peso molecular de 140KDa que se expresa o no junto al normal de 170 KDa^{255, 271} (Figura 5).

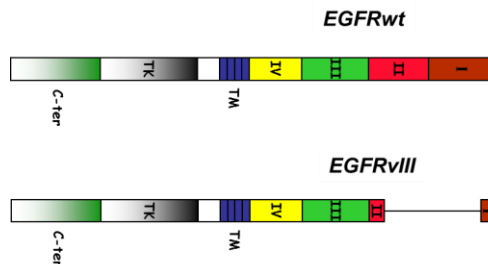


Figura 5. Diferencias entre la variante normal y la variante mutada de *EGFR*.

La amplificación de *EGFR* se vincula con la actividad de las vías de señalización *PI3K-AKT-mTOR* y *Ras-MAPK*, la sobrerregulación de estas vías se asocia con un mal pronóstico, pues son vías de transducción de señales que regulan la proliferación celular^{127, 129}. Las alteraciones genéticas del *EGFR*, incluyendo mutaciones, reordenamientos, splicing alternativo y amplificaciones focales, son las lesiones dominantes en los Receptores Tirosina quinasa (RTK)⁸⁵.

1.2.1.3 Valor pronóstico y terapéutico de la amplificación de *EGFR* en el glioblastoma

El valor pronóstico y terapéutico de la amplificación de *EGFR* no se conoce con exactitud y para ello se siguen buscando diferencias significativas en la supervivencia de los pacientes en los casos con y sin amplificación del gen^{50,65,185,198,240,294,339}. En el proceso de desarrollo de agentes terapéuticos que tienen como dianas específicas algún componente de las rutas de señalización, el receptor EGFR es una de esas dianas atractivas debido al papel importante que se le ha asignado en la patogénesis del glioblastoma^{65,205}.

Existe un gran interés en diseñar inhibidores de la actividad tirosina-quinasa en el receptor EGFR y en el resto de receptores de su familia estructural. Es esta la razón por la que se han desarrollado terapias contra el receptor, tanto agentes contra el dominio extracelular de unión a ligando como del dominio intracelular donde reside la propia actividad catalítica. La inhibición de la señal de EGFR debería producir un efecto citostático en las células de GB^{105,122,205,240}.

Existe un amplio sustento experimental y clínico que avala el hecho de que el EGFR es un elemento clave en muchos cánceres y como consecuencia de ello, una diana terapéutica adecuada. De las múltiples estrategias estudiadas para inhibir al receptor, dos aproximaciones terapéuticas se han mostrado como las más consistentes²⁴⁰:

- Los anticuerpos monoclonales, que se unen al dominio externo del receptor con alta afinidad, compitiendo con sus ligandos naturales y bloqueando así, la activación de aquel.

- Las pequeñas moléculas inhibitoras de la actividad enzimática tirosina-quinasa del receptor (TKIs). Estas previenen la autofosforilación del dominio tirosina-quinasa intracelular del receptor.

El abordaje farmacológico se ha realizado con otros enfoques, que si bien aún no se encuentran plenamente desarrollados, suponen una vía muy interesante para el desarrollo de nuevos fármacos. Estos incluyen: el uso de proteínas recombinantes, TGF o EGF conjugadas con toxinas (toxina de *Pseudomonas aeruginosa*); EGF conjugado con genisteína (un TKI natural de amplio espectro), vacunas contra EGFR; y el uso de oligonucleótidos antisentido frente al mRNA del *EGFR*, entre otros^{9, 235,246,293}.

Una limitación importante para una mayor exploración del potencial terapéutico del EGFR es la falta de un buen modelo experimental, ya sea *in vitro* e *in vivo*, para el modelado de los enfoques dirigidos al EGFR, debido a que la amplificación y expresión del *EGFR/EGFRvIII* generalmente se pierde rápidamente en las células de glioblastoma en cultivos⁸⁹.

1.2.2 Alteraciones moleculares en las vías de señalización relacionadas con *EGFR* en glioblastomas

Diferentes vías de señalización están implicadas en el desarrollo del glioblastoma, estando alterados algunos de sus componentes. De ellas las tres vías más importantes, EGFR/RAS/NF1/PTEN/PI3K, TP53/MDM2/MDM4/p14^{ARF} y p16^{INK4a}/CDK4/RB1, muestran una misma tendencia, una mutua exclusión de alteraciones en los componentes de una misma ruta, lo que sugiere que las alteraciones son funcionalmente equivalentes. La desregulación simultánea de las tres vías es crítica en la patogénesis del GB, y se estima que están alteradas en un 77% de los casos¹²⁷. Estas tres vías de señalización se revisan a continuación (Figura 6).

Vía *EGFR/RAS/NF1/PTEN/PI3K*

Los receptores de crecimiento (EGFR, PDGFRA) se activan a través de la unión de sus respectivos ligandos (por ejemplo, EGF, TGF- α , PDGF) a su dominio extracelular, lo que resulta con el reclutamiento

Vía *TP53/MDM2/MDM4/p14^{ARF}*

La vía de *TP53* puede estar alterada en muchos puntos, entre ellos los genes que controlan los niveles celulares de p53. Los niveles de p53 salvaje se controlan postraduccionalmente por la actividad de la proteína MDM2. En situación normal se une a p53 y la lleva desde el núcleo al citoplasma donde la actividad de MDM2 como ubiquitina ligasa (E3) inicia el proceso de degradación. La sobreexpresión de MDM2 puede llevar a la acumulación de p53. A su vez *p14^{ARF}* se une a *MDM2*, produciendo así la estabilización del complejo^{118,131,267}. Se ha descubierto un miembro adicional de la familia *MDM2*, denominado *MDM4*, que actúa como un importante regulador negativo de p53²⁸⁷.

Las mutaciones *TP53* son significativamente más frecuentes en glioblastomas secundarios que en primarios (65% vs 28%). De las mutaciones de *TP53* en los glioblastomas secundarios, el 57% se encuentra en los codones hot-spot 248 y 273, mientras que en los glioblastomas primarios, se distribuyen de manera más uniforme, G:C → A:T¹⁸⁹.

La pérdida de expresión de *p14^{ARF}* debido a la delección homocigótica o a la metilación de su promotor es frecuente en glioblastomas primarios (50%). Así mismo, la amplificación de *MDM2* no es muy frecuente (<15%), y ocurre casi exclusivamente en glioblastomas primarios que carecen de una mutación en *TP53*. Al menos una alteración en la vía de *TP53 /MDM2/ p14^{ARF}* (mutaciones de *TP53*, delección homocigótica de *p14^{ARF}*, metilación del promotor de *p14^{ARF}*, amplificación de *MDM2*) se ha observado en aproximadamente el 50% de los glioblastomas primarios, y en más del 70% de los glioblastomas secundarios^{253, 280, 281, 317}.

Vía *p16^{INK4a}/CDK4/RB1*

La proteína RB1 controla la progresión a G1 en la fase S del ciclo celular. El complejo CDK4/ciclina D1 fosforila la proteína RB1, induciendo con ello la liberación de E2F, factor de transcripción que activa los genes implicados en la transición G1→S. *p16^{INK4a}* se une a CDK4, e inhibe el complejo CDK4/ciclina D1, y por tanto inhibe la transición G1→S. La pérdida de la función normal de RB1 puede resultar de la expresión alterada de cualquiera de los genes *p16^{INK4a}*, *CDK4*, o *RB1*^{60,309}. La delección

homocigótica de *p16INK4a*, la amplificación de *CDK4*, y la pérdida de *RBI* son en gran parte mutuamente excluyentes; en general la frecuencia de estas alteraciones es del 50% en glioblastomas primarios y aproximadamente el 40% en glioblastomas secundarios. La frecuencia global de alteraciones genéticas en esta vía de señalización es del 78% de los casos²⁸⁰.

Cuando las alteraciones en estas vías de señalización las relacionamos con los GBs *IDH* no mutado y con los GBs *IDH* mutado, se han podido establecer los perfiles genéticos que caracterizan a estas dos variantes (Figura 7).

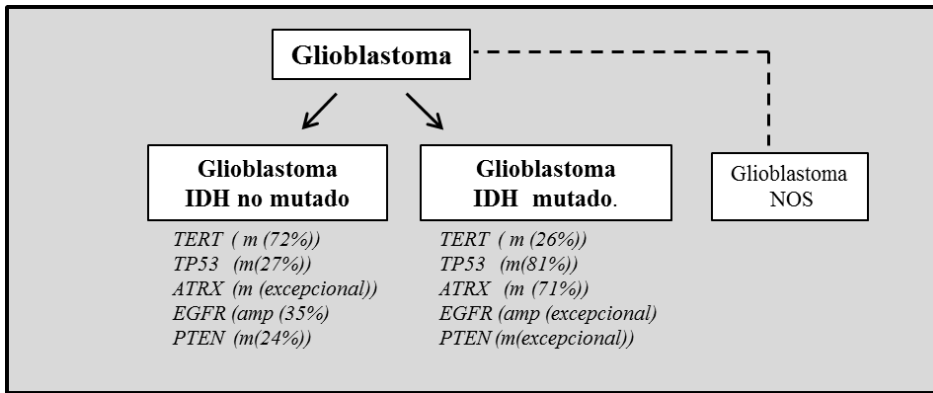


Figura 7. Alteraciones moleculares más frecuentes implicadas en el GB. amp: amplificación; m: mutación.

1.2.3 Patrones moleculares del glioblastoma según perfiles transcripcionales

El estudio de los perfiles transcripcionales en los diferentes gliomas, han permitido establecer relaciones entre su biología y los estadios del desarrollo neuroglial^{34, 128, 231, 297}. Por una parte, en los gliomas de grado III y grado IV se han considerado tres subtipos: proneural, proliferativo y mesenquimal, siguiendo la semejanza con el perfil de expresión génica con el tejido nervioso fetal y adulto (proneural), con células madre hematopoyéticas (proliferativo) y con varios tejidos de estirpe mesenquimal (mesenquimal).

En estos estudios se ha observado que prácticamente todos los tumores de grado III, pertenecen a la categoría proneural, junto a un subgrupo de GBs en pacientes jóvenes con cursos clínicos prolongados. Por otro lado, los tumores recurrentes parecen cambiar su perfil de mRNA inicial hacia un perfil más mesenquimal.

En GB primarios se han obtenido patrones similares en el estudio publicado por el TCGA (Atlas Genómico del cáncer)^{280,297}. Además de confirmar los patrones proneural y mesenquimal se identificaron dos patrones adicionales denominados clásico y neural. Cabe destacar que, al integrar estos resultados con datos del número de copias, transcripcionales, de secuenciación y proteómicos, los subgrupos de GB se correlacionan de forma efectiva con las alteraciones características de las vías de señalización más importantes en los glioblastomas primarios^{5,34,297}: la categoría clásica con alteraciones en *EGFR* (25%-30%), la categoría proneural con alteraciones en *PDGFR*, *IDH1* o *IDH2* (25%-30%) y la categoría mesenquimal con alteraciones en *NF1* (30%-40%)^{5,127} (Tabla 1).

El TCGA recoge los datos sobre las alteraciones moleculares y los cambios patológicos, y de esta forma se ha podido realizar una clasificación complementaria a la histológica para los GBs. En este sentido se mantienen para los glioblastomas primarios las clasificaciones de proneural, neural, clásico y mesenquimal.

Tabla 1. Clasificación molecular de los gliomas malignos según la TCGA.

Variantes de gliomas según WHO	Análisis de los GB primarios	Alteraciones moleculares en los GB primarios
Proneural	Proneural	Amplificación o mutación en <i>PDGF</i> . Mutación en <i>IDH1/2</i>
Mesenquimal	Mesenquimal	Deleción o mutación en <i>NF1</i>
Mesenquimal	Clásico	Amplificación o mutación de <i>EGFR</i>
Subclases no definidas	Neural	-

1.3 Factores epigenéticos: microRNAs y regulación génica

Uno de los factores epigenéticos ya abordados en el apartado 1.2 fue la metilación en genes en el GB, en este apartado nos centraremos en lo que ha sido el descubrimiento de nuevos sistemas de regulación génica bajo el control de RNA de pequeño tamaño que ha tenido un impacto significativo en la biología molecular. Algunos de los genes implicados en las distintas vías de señalización están también regulados por miRNA, entre ellas, las vías de señalización dependientes de *EGFR* en el GB.

1.3.1 MicroRNAs: Concepto, función y mecanismos de acción

Los miRNA, son RNAs de pequeño tamaño, aproximadamente 23 nucleótidos, de cadena sencilla, que actúan como moléculas reguladoras de la expresión génica, inhibiendo la traducción de proteínas uniéndose al mRNA y no codificando para proteínas¹⁶². Juegan un papel muy importante en la regulación de la expresión porque pueden unirse por complementariedad con los RNA mensajeros de estas proteínas e inducir su represión post-transcripcional, además de inducir la activación de la síntesis proteica^{13,295}.

La función de los miRNA, no está limitada a la represión de genes individuales, pudiendo también actuar modulando simultáneamente varias dianas y desreprimiendo otras con rápida reactivación. Juegan un papel importante en el desarrollo y diferenciación celular, controlando el ciclo celular y los procesos de envejecimiento y apoptosis¹³.

Existen trabajos publicados que indican que los miRNA regulan la expresión génica de formas diferentes actuando a nivel pos-transcripcional y de la traducción de proteínas^{14,76,80}.

A nivel post-transcripcional, los miRNA en animales pueden inducir una degradación significativa de los mRNA diana. Una característica de los miRNAs es su apÁreamiento imperfecto con su mRNA diana. Generalmente se unen a la región 3' UTR (región no traducible)¹⁴. Los miRNA promueven la degradación de los mRNA diana porque inducen la deadenilación del mRNA mediante la eliminación de la caperuza en el extremo 5'⁷⁷. Así mismo, los microRNA podrían también silenciar sus mRNA dianas

secuestrándolos en sitios citoplásmicos discretos, los cuerpos de procesamiento de mRNA o P bodies, que carecen de maquinaria de traducción⁵¹.

Por otra parte, a nivel de la traducción de proteínas, los miRNAs pueden incidir en sus tres etapas principales: iniciación, elongación y terminación de las cadenas polipeptídicas⁷⁶ y pueden lograr:

- la inhibición de la iniciación de la traducción.
- la inhibición de la elongación de la traducción.
- la degradación de la proteína durante la traducción.
- la terminación prematura de la traducción (por disgregación de los ribosomas).

Se conoce que la utilización de un mecanismo u otro depende del grado de complementariedad del miRNA y su mRNA diana. Si la complementariedad entre ellos es elevada o total se producirá la degradación del mRNA y si la complementariedad no es total se favorece la inhibición de la traducción¹⁰. También se requieren varias regiones de unión de miRNAs para una interacción miRNA-mRNA diana de alta afinidad que suprima la traducción¹⁸³.

Se ha estudiado la posibilidad de que los miRNAs realicen represión transcripcional y que a la vez estén relacionados con la regulación de la cromatina. Para apoyar esta hipótesis se ha observado que en la reciente predicción de genes diana de miRNAs hay proteínas modificadoras de histonas, entre ellas histonas metiltransferasas e histonas deacetilasas¹⁷⁷.

Sin embargo, a pesar de las discrepancias existentes entre los diferentes mecanismos propuestos, los apoyos basados en modelos experimentales para cada mecanismo son variados, y son el objeto actual de intensos estudios, para tratar de elucidar los mecanismos exactos de regulación de los miRNAs.

Predicción de genes dianas de miRNAs

Se han desarrollado varias plataformas computacionales que permiten la predicción de estos genes dianas y que se detallan en la tabla 2. La mayoría de algoritmos se basan en la complementariedad de secuencia miRNA-mRNA ^{99,177}.

Tabla 2. Bases de datos y fuentes para la predicción de diana de miRNAs

Base de datos /Fuentes	Dirección web
miRanda	http://www.microrna.org/microrna/home.do
miRBase	http://www.mirbase.org/
TargetScan	http://www.targetscan.org/
PicTar	http://pictar.mdc-berlin.de/
Diana Tools	http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php
miRNAMap	http://mirnamap.mbc.nctu.edu.tw/

Los resultados derivados del uso de estos algoritmos de análisis bioinformático han sido validados mediante ensayos experimentales *in vitro* e *in vivo*³⁶, para reforzar, validar, y retroalimentar la capacidad y la fiabilidad de estos programas para predecir genes dianas.

1.3.2 Los microRNAs en el desarrollo neoplásico

La expresión de miRNAs se encuentra alterada en cáncer y la expresión anormal de estos es una característica común de los procesos neoplásicos; además del hecho de que los miRNAs humanos se encuentran localizados en regiones genómicas asociadas a cáncer ^{43,61}.

La expresión alterada de los miRNAs es un mecanismo que desencadena su ganancia o pérdida de función en las células cancerosas. Estos pueden encontrarse en las células *dowregulated* (con baja expresión) o *upregulated* (con sobreexpresión) ⁴³.

Existen diferentes mecanismos que alteran la expresión de los miRNAs, como son la activación de factores de transcripción oncogénicos; la presencia de alteraciones cromosómicas como la amplificación genómica,

la delección cromosómica, las mutaciones puntuales; y la metilación aberrante de los promotores^{42, 110, 217}.

La expresión de algunos miRNAs esta inhibida en diferentes tumores actuando como genes supresores tumorales o TS-miRs, mientras que en otros se encuentran sobrepresados actuando como oncogenes, también conocidos como onco-miRs^{69, 162}.

Los miRNAs con niveles reducidos reflejan defectos en cualquier etapa de la biogénesis miRNA, lo que produce una expresión inapropiada de oncoproteínas. Este mecanismo se relaciona con aumento de la proliferación, invasión y angiogénesis, o con reducción de los niveles de apoptosis y diferenciación, potenciando la formación de tumores.

Por el contrario, los niveles elevados de miRNA maduro podrían reflejar la amplificación del gen miRNA, un promotor constitutivamente activo, el aumento de la eficiencia en el procesamiento de los genes miRNA o aumento de la estabilidad de los genes miRNAs, por lo tanto la sobreexpresión de un miRNA oncogénico elimina la expresión de los genes supresores de tumores, que conduce a la progresión del cáncer (Figura 8).

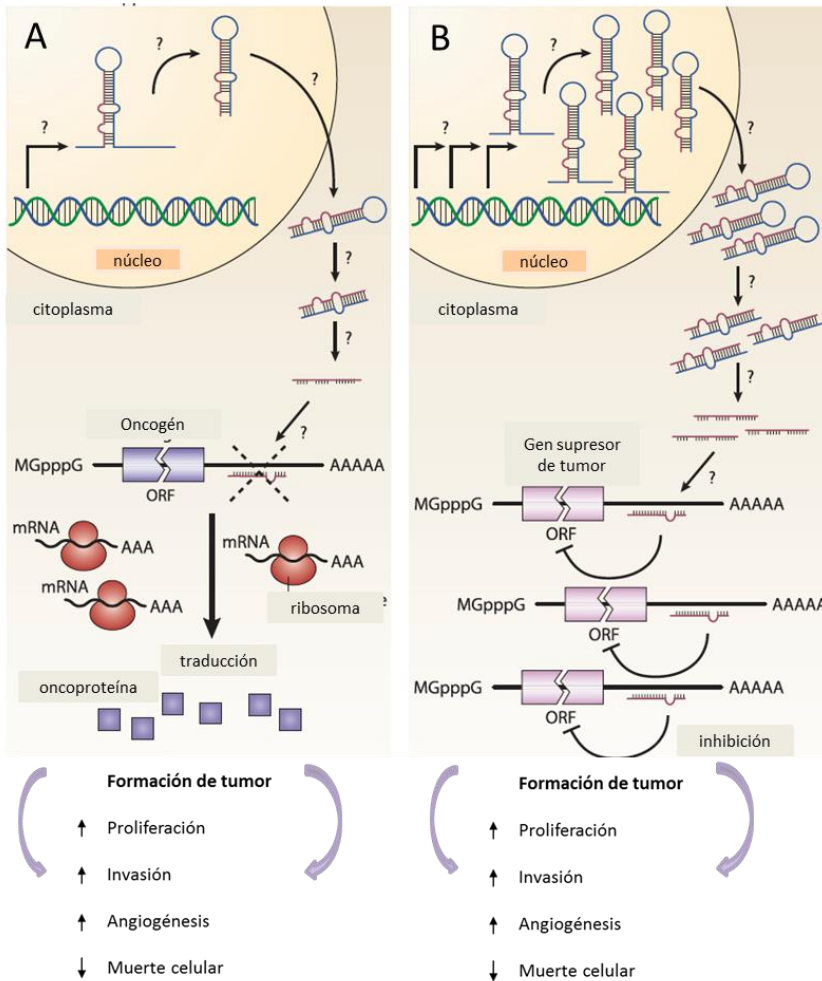


Figura 8. A) Esquema del funcionamiento del miRNA como supresor tumoral. Los signos de interrogante muestran defectos en cualquier etapa de la biogénesis miRNA B) Esquema del funcionamiento del miRNA como un oncogén. Los signos de interrogante muestran incrementos de la eficiencia y procesado de miRNA durante la biogénesis ³⁰⁴ *figura modificada*.

miRNA con actividad supresora de tumor

Uno de los primeros indicios sobre la participación de miRNAs en cáncer fueron los publicados por *Calin en 2002*⁴¹, que observaron que miR-15 y miR-16 se localizaban en una región cromosómica que se perdía de forma recurrente en la mitad de los casos con leucemia linfocítica crónica (CLL). En células normales estos miRNAs se encuentran con baja expresión y actúan como supresores de tumores teniendo como diana directa el mRNA de *BCL2*, sintetizándose la proteína anti-apoptótica BCL2. El gen *BCL2* es considerado un oncogén que está frecuentemente sobreexpresado en CLL.

Otro de los primeros miRNAs estudiados fue la familia de miRNA let-7, los cuales tiene un rol importante en el cáncer de pulmón y colon. Se ha estudiado que actúa como supresor tumoral mediante la regulación del oncogen *RAS* inhibiendo la expresión del mismo^{2,140}.

Desde entonces un largo número de miRNAs han mostrado una baja regulación en cáncer como, miR-143 y miR-145 en cáncer colorectal^{3,237}, miR-145 en cáncer de mama¹³², y miR-129 en cáncer gástrico¹³⁷, entre otros (Tabla 3).

miRNA con actividad oncogénica

Los onco-miRs están frecuentemente sobreexpresados en cáncer y muestran una actividad proliferativa y antiapoptótica. En la tabla 3 se muestran algunos de los oncogenes más estudiados.

El miR-155 fue uno de los primeros onco-miRs identificados. Las primeras observaciones mostraron que la alta expresión de este miRNA estaba asociada a una variante más agresiva del tumor y a una baja supervivencia en adenocarcinoma de pulmón y en leucemias⁷¹.

La región 13q21 se encuentra frecuentemente amplificada en tumores sólidos como gliomas, linfomas, cáncer de vejiga, tumores de cabeza y cuello, entre otros. La amplificación en esta región provoca la sobreexpresión de la familia miR-17-92¹⁰⁸. El miR-21 también se encuentra sobreexpresado en numerosos tumores como el cáncer de mama, páncreas y en GB. La actividad anti-apoptótica también se ha publicado como una característica de miR-21²⁵⁶. La inhibición de miR-21 en cáncer de mama y en GB condujo a la inhibición de la actividad de BCL-2, a la reactivación de caspasas y al aumento de la apoptosis⁴⁷.

Tabla 3. Ejemplos más relevantes de miRNAs involucrados en cáncer.

miRNAs	Actividad	Dianas	Tipos de cáncer	Referencias
Familia Let-7	ST	RAS, MYC, CDK6	Pulmón Colón	3 140
Familia miR-34	ST	CDK4,CDK6, BCL2	Neuroblastoma Colón	312 278
miR15 miR-16	ST	BCL2	Leucemia linfocítica crónica (CLL)	56
miR-29b	ST	MCL-1, TCL-1	Leucemia mieloide aguda (AML)	91
miR-124a	ST	CDK6	Colon, mama, pulmón linfomas, leucemia	193
miR-143	ST	FNDC38, BCL2,HK2, PKCε	Colon, carcinoma, pulmón, osteosarcoma	329 331 79
miR-145	ST	Fli-1,MYC, IRS-1	Colon , mama, AML	3 132
miR-379	ST	AKT, FAK	carcinomas	166
miR-17-92	O	E2F1, Tsp1, CTGF	Linfoma, colon, Leucemia mieloide aguda (AML)	110 274 296
miR-21	O	PTEN, TPM1, BCL2 PDCD4	Glioblastoma, mama, pulmón, páncreas, carcinomas	132 256 47 204 82
miR-155	O	TP53	Linfoma, mama	71 132
miR-372 /miR-373	O	LAST2	Tumor de célula germinal testicular	301

ST: Supresor tumoral, O: Oncogén

Aplicaciones de los miRNAs en el diagnóstico, pronóstico y terapia molecular de las neoplasias

El estudio de los mecanismos de regulación de la expresión génica por parte de los miRNAs, ha permitido la generación de alternativas viables para el diagnóstico, pronóstico y el tratamiento de diversas enfermedades, fundamentalmente el cáncer.

Los miRNAs tienen grandes ventajas porque son relativamente estables, y para el estudio de su expresión no se requiere gran cantidad de muestra. Se puede obtener de tejido fresco, tejido fijado en parafina, y de fluidos biológicos como suero, a través de una biopsia líquida o saliva que son vías menos invasivas para el paciente ^{120,225,306}.

Como método diagnóstico, el uso de perfiles de miRNAs ayuda a identificar una gran variedad de tipos tumorales, aplicándose en carcinoma de páncreas ²⁴⁴, carcinoma papilar de tiroides ¹⁰⁹, el cáncer colorectal ¹¹, y cáncer de pulmón ³²². Además, en situaciones donde el uso de perfiles de expresión de mRNA ha resultado ser poco sensible, se ha demostrado que los perfiles de expresión miRNAs se pueden usar para el diagnóstico ^{192, 239}.

Desde el punto de vista pronóstico han demostrado su utilidad como indicador de evolución clínica, de la tendencia a la recurrencia y a la metástasis ^{53, 215}. Para elegir la terapia más eficaz, los perfiles de expresión de miRNA pueden llegar a ser una herramienta para la identificación de subgrupos de los pacientes que se beneficiarán de un tratamiento alternativo⁴².

En el 2007, Wurdinger y Costa publicaron que se pueden utilizar métodos que corrijan la expresión de un miRNA que se encuentre desregulando la acción de un mRNA, lo que provoca una alteración molecular que conlleva a una patología, lo que podría dar como resultado la recuperación de una función normal. Por el contrario en enfermedades que vienen dadas por la desregulación de un patrón de expresión de mRNA y donde el perfil de miRNAs es normal, se podría intentar utilizar miRNAs naturales o sintéticos para normalizar los defectos de la expresión de mRNA³²⁰ (Figura 9).

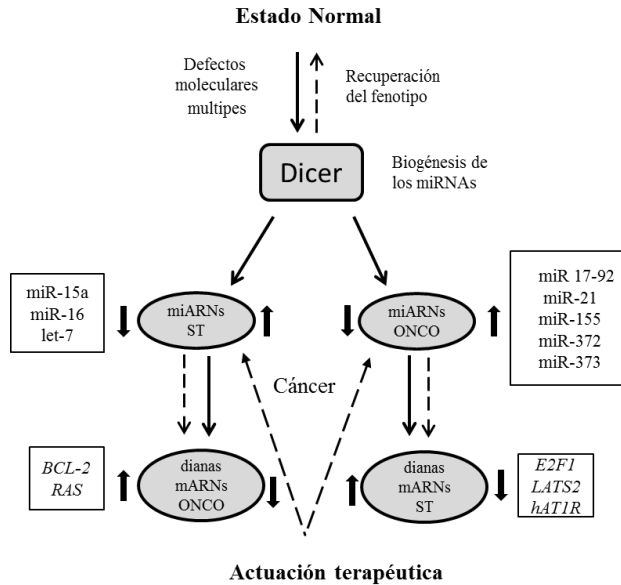


Figura 9. Niveles en los que se plantea la posible interacción terapéutica sobre los miRNAs. ST. Supresores de Tumores. ONCO. Oncogenes.

1.3.3 MicroRNAs en el glioblastoma

Se han publicado patrones alterados de expresión de miRNA en GB. Algunos miRNAs específicos han demostrado ser supresores tumorales u oncogénicos. Aproximadamente el 30% de los miRNAs evaluados se presentan desregulados en varios estudios independientes ^{47,49,55,87,150,211,332}.

Se han identificado miRNAs significativos en la biopatología del glioblastoma como: miR-21, miR-128, miR-181, miR-221/222, miR-137, miR-124, miR-7, entre otros ^{7,49,87, 94,150,167,195, 211,332}.

El primer oncogen identificado en glioblastoma fue **el miR-21** ⁴⁷. Este miRNA es uno de los de mayor sobreexpresión en gliomas con respecto al tejido normal, lo que sugiere un papel oncogénico. EL miR-21 actúa como un oncogén que regula múltiples parámetros de malignidad en este tumor. La inhibición de este miRNA aumenta la apoptosis, disminuye el crecimiento e

invasión y podría reducir la quimioresistencia^{47,338}. Se ha señalado que la alta expresión de este micro se relaciona con una baja supervivencia de los pacientes con GB³³⁴.

Ciafré⁵⁵ describe miRNAs que se encuentran con baja expresión como el miR-128 y la familia miR-181, que se comportan como supresores de tumores. **El miR-128** tiene la capacidad de suprimir el crecimiento tumoral, por tener como dianas directas, genes que están implicados en la renovación de células madres. Además, se ha encontrado que este miRNA puede reprimir dos factores de crecimiento como son: EGFR y PDGFA, que se encuentran normalmente sobrepresados en GBs²²⁴.

Los miRNAs **miR-221** y **miR-222** se encuentran sobrepresados en GB. Su función se ha explorado de manera conjunta, pues tienen las mismas dianas moleculares. Se ha descrito que ambos, reprimen la expresión del regulador del ciclo celular p27^{94,332}. Por otro lado, se ha demostrado que las células de la línea celular U87 requerían una alta actividad de miR-221/222 para mantener los niveles de p27 y el estado proliferativo, por lo que son considerados potenciales oncogenes¹⁷².

El miR-137 se encuentra poco expresado en las células de GBs. En muchas ocasiones se ha estudiado su papel en relación a otros miRNAs por ejemplo, el miR-124. Estos estudios han demostrado su efecto antiproliferativo y anti-invasivo cuando esté miRNA se sobrepresa, influyendo sobre la diana *CDK6*²⁵⁹.

Otros trabajos establecen la baja expresión del **miR-7** en GBs. *EGFR* y *IRS-2* fueron identificados como dos dianas directas del miR-7. La transfección del pre-miR-7 disminuye la fosforilación de AKT y reduce la severa invasión de las células del GB¹⁵⁰.

El miR-26 es un regulador de la expresión de *PTEN*, el cual es un regulador de la ruta AKT y tiene un papel central en la biología del glioma¹²⁶.

Una de las más interesantes investigaciones, es la relacionada con el circuito cerrado de regulación entre *TP53* y **miR-25/32**, los cuales son regulados negativamente por *TP53*, pero a la vez estos miRNAs pueden estabilizar la proteína p53 y disminuir la tumorigenicidad, mediante la acción de estos sobre las dianas *MDM2* y *TSC1*, tal y como se observó en células de la línea celular U87 de glioblastoma²⁷².

Todos estos miRNAs están relacionados con las tres vías de señalización más importantes afectadas en glioblastoma (Figura 10). Es evidente que los miRNAs actúan como reguladores a diferentes niveles de la gliomagénesis. Regulan la proliferación (miR-7, miR-21, miR-128, miR-221, miR-26a), la apoptosis (miR-21, miR-25/32) y la resistencia a quimioterapia y radioterapia (miR-21 y miR-181a)³¹⁹.

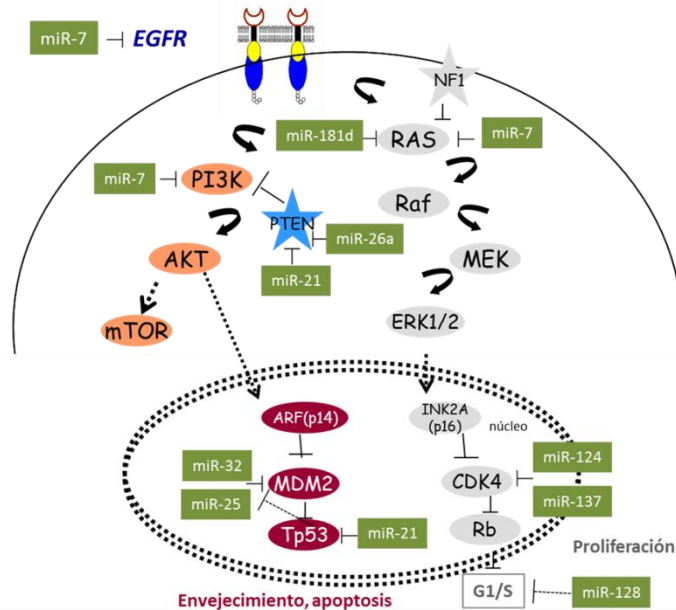


Figura 10. Esquema que muestra la interacción de miRNAs con las vías *RTK/RAS/PI3K p53* y *RB* en Glioblastoma.

Otros microRNAs se han estudiado relacionados con los glioblastomas. El **miR-148a** que presenta actividad oncogénica, tiene utilidad pronóstica en este tumor. La expresión de miR-148a en muestras humanas de glioblastoma, líneas celulares, y células madre neoplásicas (GICs), es elevada, en comparación con el cerebro y astrocitos humanos normales. Los niveles altos son un indicador de riesgo para la supervivencia de los pacientes de glioblastoma. Funcionalmente, la sobreexpresión de miR-148a aumenta el crecimiento celular, la supervivencia, la migración y la invasión de las células de glioblastoma y promueve la formación de neuroesferas. Se han identificado algunas dianas directas del miR-148a, el

receptor EGFR, el *MIG6* (gen 6 mitógeno inducible) y la proteína proapoptótica BIM¹⁵².

Los estudios sobre el **miR-338-5p** han demostrado una disminución de la proliferación y una detención del ciclo celular en líneas celulares de *GB*²⁴. Dado que la radioterapia es actualmente la principal modalidad de tratamiento en este tumor, se combinaron la sobreexpresión del miR-338-5p con radiación, lo que llevó a una disminución significativa de la proliferación celular, aumentó la detención del ciclo celular y la apoptosis, en comparación con las células que sólo habían recibido radiación. Para aclarar mejor el mecanismo de acción, se realizaron perfiles de expresión génica que revelaron una relación directa con los genes *NDFIP1*, *RHEB* y *PPP2R5A*. Estos genes están involucrados en respuesta al daño del DNA, en la proliferación y en la regulación del ciclo celular²⁴.

Recientemente se ha demostrado que la sobreexpresión de **miR-126** suprime la proliferación de células de glioma y la invasión *in vitro*. *KRAS* que participa en la vía ERK es diana directa del miR-126 a través de la unión de dos sitios en la región no traducida 3 '(3'-UTR) del gen *KRAS*. Además, la sobrerregulación de miR-126 contribuye a la activación aberrante de la señalización de ERK, e inhibe la proliferación celular y la invasión a través de la regulación de *KRAS*. Por lo tanto, se sospecha que el miR-126 podría ser una posible diana terapéutica para el glioma de alto grado¹⁸¹.

Los perfiles de miRNAs estudiados en GBs han sido realizados mediante microarrays de expresión. En este sentido, se han identificado en el TCGA²⁸⁰ 5 subgrupos de GBs utilizando perfiles de expresión de miRNAs y de mRNA¹⁵².

De acuerdo con esta agrupación los subgrupos de GBs son: 'oligo neuronal', 'glía radial', 'neuronal', 'neuro mesenquimales', y 'astrocítico'¹⁵³. Los microRNAs asociados a cada subgrupo se refieren en la tabla 4.

Tabla 4. miRNAs que identifican los cinco subgrupos de glioblastoma relacionados con los precursores neurales.

Subgrupos	miRNAs
Neural	565,487b,128a,128b,136,137,376a,338,218, 219,377,127,124a,7,23b,27b,582.
Oligoneural	26a,135b,176a,196b,10b,9,182,130a,20a,25, 424,340,92,96,173p,106a,175p,182,18a,183,19 a,19b,181a,181b,149,345,505,362
Glial radial	99b,125a,92b,30a-5p,125b,100,99a,let-7, let7d,26b,96,195,135 ^a ,let7e,let7b,let7a,335, 126, 146a, 143,145
Astrocítico	191,425-5p,192,200b,200a,29c,29b,29a,24, 27a,23a,223,34a,142-3p,146b,22,21,222, 155,148a,193a,204,31,34b,210,193b,339
Neuro-mesenquimal	623,584,629,630,765,671,638,663,801,769- 3p,452,451,206,370,490,486,492,493-3p,513, 494,575,572

Esta agrupación apunta al origen de las células de tumores cerebrales, y revela el gran potencial de los miRNAs como elementos sensibles que ayudarían a identificar mejor la biopatología del glioblastoma, como un tumor que se presenta con una gran heterogeneidad ¹⁵³.

A pesar de todos estos avances, los estudios de los miRNA en el GB aún son escasos, y su relación con las vías de señalización, en particular, las dependientes de *EGFR* están por aclarar.

1.3.4 Implicación de la familia de los miR-200 en la transición epitelio-mesenquimal

La familia miR-200 consta de cinco miembros localizados en dos cromosomas distintos. Los miR-200a, miR-200b y miR-429 se encuentran en el cromosoma 1, y miR-200c y miR-141 se encuentran en el cromosoma 12 ¹⁵⁷.

Su función se asocia con la progresión tumoral, y juega un papel esencial en la transición epitelio-mesenquimal (EMT) ^{209,226}.

La transición epitelio-mesenquimal (EMT) es un concepto que surge para explicar procesos celulares en el desarrollo embrionario, y comparte muchas similitudes con la progresión del cáncer ^{66,283}.

Es un proceso celular complejo que refleja un alto nivel de plasticidad fenotípica, que define la conversión de células epiteliales en células de fenotipo mesenquimal con alta capacidad migratoria. Inicialmente las células epiteliales se encuentran unidas entre sí por uniones adherentes conformadas por proteínas como E-Caderina, cateninas y anillos de actina, entre otras. Durante la transición epitelio-mesenquimal, uno de los procesos que se produce, es la represión en la transcripción de los genes que codifican diferentes uniones intercelulares, perdiéndose la polaridad apico-basal de la célula. Además, la célula sufre cambios en el citoesqueleto que promueven una constricción apical en la célula y una desorganización de la membrana basal. Estos cambios originan la migración celular (Figura 11). La reorganización de la caderina (el cambio de la E-caderina a N-caderina) es un sello distintivo de la EMT como motor de la pérdida de contacto célula a célula ^{144,145}.

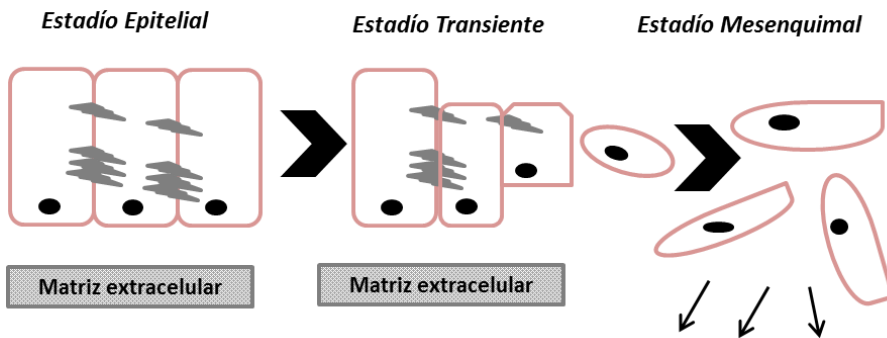


Figura 11. Presentación esquemática de una transición epitelio - mesenquimal (EMT).

En 2008, Park ²²⁶, identificó la familia miR-200 como un marcador importante para las células que expresaban la E-caderina, pero carecían de la expresión de vimentina. La expresión de miR-200 causó la sobreexpresión de la E-caderina en diferentes líneas celulares de cáncer de ovario, reduciendo la motilidad de las células. Por el contrario, la inhibición de miR-200 redujo la expresión de E-caderina, aumentó la expresión de

vimentina, e indujo la EMT. Estos datos identifican al miR-200 como un potente marcador y factor determinante del fenotipo epitelial de las células cancerosas.

La E-Caderina (codificada por el gen *CDH1*) contribuye a retener un fenotipo epitelial, es considerada un inhibidor de la invasión y la migración en numerosas líneas celulares. La E-Caderina puede quedar inactivada por alteraciones en el gen *CDH1*, como pueden ser mutaciones somáticas, o hipermetilación del promotor del gen, causando la pérdida de función. Sin embargo, el evento más frecuente es la inhibición de la transcripción de la E-Caderina por factores de transcripción específicos como pueden ser la familia ZEB (*ZEB1/2*). Ello permitiría la invasión local y la diseminación de las células cancerosas, perdiendo de esta forma su fenotipo epitelial y ganando un fenotipo mesenquimal^{96 97}.

El factor de transcripción ZEB1 codificado por el gen *TCF8*, actúa en las regiones reguladoras de los genes diana como es *CDH1*, reprimiendo su acción y por tanto contribuyendo a la progresión maligna tumoral en diferentes tipos de tumores como cáncer de endometrio y cáncer de mama^{52,222 261, 265}. De este modo, ZEB1 es un mediador crucial de la EMT, ejerciendo sus efectos sobre la inducción de EMT mediante la inhibición de la expresión de E-caderina y de miRNAs^{39,226,308} (*Figura 12*).

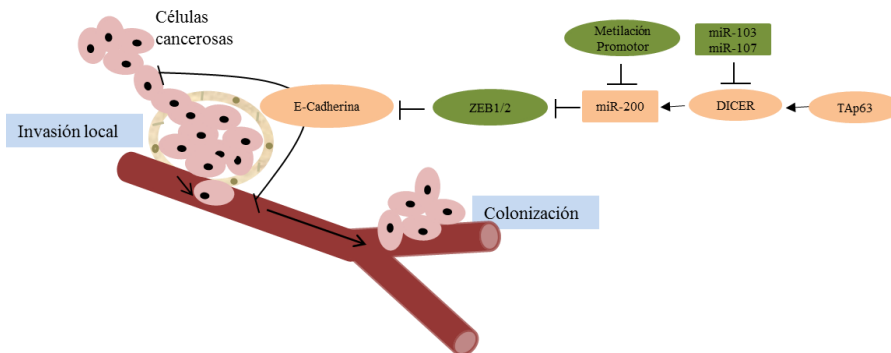


Figura 12. Papel del miR-200 y ZEB1 en la EMT y en la progresión tumoral.

El papel de miR-200 en EMT y en la progresión tumoral, infiltración y metástasis, se ha relacionado con varios tipos de cáncer, incluyendo: cáncer de vejiga¹, cáncer de mama²⁸⁹, cáncer de ovario¹²¹, cáncer de páncreas^{182, 336}, cáncer de próstata¹⁵⁶, cáncer de pulmón,⁹² cáncer colorectal^{124,232} y cáncer de tiroides³³³.

El papel del EGFR en la transición EMT no está muy documentado. En algunos tipos tumorales la activación de EGFR por su ligando (EGF) induce esta transición. En la mayoría de los cánceres anaplásicos de tiroides, EGFR se sobreexpresa y cuando se activa por EGF, una cascada de señalización se activa, resultando un aumento de la migración y la invasión^{175, 333}. En este proceso, EGFR activa el gen *TCF8* que codifica a ZEB1 e inhibe la expresión de E-caderina, lo que favorece la metástasis en muchos tipos de cáncer^{308,310}.

Estudio de los miR-200 en glioblastoma

Los estudios de la familia miR-200 y en concreto el del miR-200c asociado a la biología del glioblastoma son muy escasos e iniciales.

Los primeros datos surgen de un estudio sobre el efecto de NVP-LDE-225 (Erismodegib), que es un inhibidor que actúa en los procesos de EMT en células madres neoplásicas de glioblastoma (GICs) inhibiendo la vía de señalización de SHH, que es una vía que regula el desarrollo neuronal. En este estudio se demostró que este inhibidor indujo la expresión de miR-200a, miR-200b, y miR-200c en GICs. La transducción de GICs con un inhibidor de la familia 200 (anti-miR-200a/b/c) bloqueó los efectos inhibitorios de Erismodegib sobre la migración celular y la invasión. Estos datos sugieren que Erismodegib inhibe la EMT por sobreexpresión de la familia miR-200⁸⁴.

Nuestro grupo en 2014, publicó un estudio donde se sugirió que miR-200c podía actuar como un regulador potencial de la migración y la invasión a través de ZEB1 en tumores primitivos de glioblastoma. Este estudio apoyaba la existencia de tres grupos de GB considerados en función del estado de amplificación de *EGFR* con diferentes niveles de ZEB1 y miR-200c. Nuestros resultados mostraron que los valores de miR-200c y de la

expresión CDH1 aparecen claramente reducidos en los GB con amplificación de *EGFR*. Este estudio es considerado el primer trabajo de la relación entre miR-200c y el patrón de amplificación de *EGFR* ²⁵⁰.

Debido a las características particulares del tejido nervioso, al carácter astrocítico neoplásico del GB, se propuso como concepto complementario al de EMT, el término **MMMI** (*Modo Mesenquimal de Migración e Invasión*) referido al proceso de infiltración en el glioblastoma ^{57,335}.

El MMMI se ha estudiado en modelos experimentales de ratón, observando como las células de glioblastoma migran individualmente usando un modo mesenquimal en su motilidad aunque no se sabe exactamente lo que inicia este comportamiento en las células de gliomas. Se observó que durante la migración, las células de GB tienen la capacidad de reorganizar la matriz extracelular, secretan metaloproteasas de matriz (MMP) en el borde de ataque, y rompen componentes extracelulares para crear corredores o vías para la migración, creando pistas que les permiten migrar por la materia blanca y por las membranas basales que revisten los vasos sanguíneos del cerebro. Este proceso es crítico y depende del ensamblaje y desensamblaje regulado por las integrinas de transmembrana ^{57, 179,335}.

Por otra parte, diferentes componentes de la vía de señalización FAK/Src son activados en GB. Los gliomas expresan elevados niveles de expresión de FAK sobre todo en los márgenes invasivos del tumor primario ³²⁷. El Src es un proto-oncogén que interacciona con FAK, la interacción de ambos es un importante determinante de la migración de células mesenquimales ¹³⁰. Tanto FAK y Src se han convertido en objetivos importantes para el tratamiento de glioblastoma ^{57,335}.

Hasta el momento se ha descrito una serie de miRNAs, con actividad tanto oncogénica como supresora tumoral, involucrados en MMMI en el GB, que afecta la migración celular, la reorganización del citoesqueleto, la invasividad y la angiogénesis, en gliomas en general ²⁰⁸ (Figura 13). Pero hasta el momento, no aparece referido en la literatura la relación del miR-200 con el MMMI en GB.

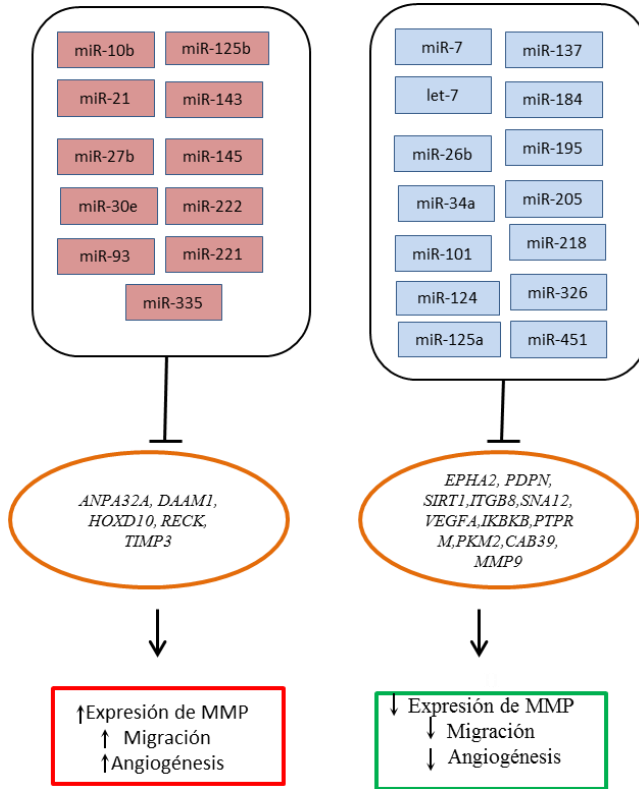


Figura 13. miRNAs implicados en el MMMI en glioma. La inhibición de dianas validadas (círculo amarillo) por miRNAs específicos, con un efecto pro-invasivo (cuadrado rojo) o efectos anti-invasivos (cuadrado verde). Cuadrados rojos representan los miRNAs sobrexpresados con actividad oncogénica. Cuadrados azules representan los miRNAs infraexpresados con función supresora de tumor.

Otros autores han denominado **EMT (-like)** al proceso observado en los tumores gliales que parece diferir de la EMT clásica y donde se produce la transición mesenquimal independientemente del paso de la E-caderina a N-caderina^{143,144,145}. La hipótesis que se ha estudiado está relacionada con la expresión de los miembros de la familia-ZEB regulada indirectamente por otros mecanismos moleculares. Se ha publicado y

validado en algunos estudios, que la inducción de ZEB1 está relacionada con la represión de E-caderina y por lo tanto con la infiltración. Dada la baja prevalencia de la E-caderina en el glioma ²⁹², se postula si ZEB1 podría afectar a la invasión en glioma a través de otros mecanismos, como mediante el factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF) que media la invasión en glioma *in vitro e in vivo*, y que se produce a través de la activación de NF-KB ^{70,144}.

Con respecto a la familia de miR-200, se ha estudiado como miR-200a inhibe la activación de reguladores de EMT-like y reduce la motilidad por represión de la vía WNT/ β -catenina en GB ²⁷⁰. Así como esta familia de miRNAs a través de los efectores ROBO1, c-MYC y MGMT podrían actuar como reguladores de la iniciación tumoral junto a ZEB1 ²⁵⁷. Pero no existen hasta el momento más estudios de esta familia de miRNAs y este proceso, y tampoco relacionados con el glioblastoma.

El fenotipo mesenquimal de la clasificación molecular de los GB se asocia con el aumento de la migración y la invasión de sus células. Además, los perfiles de expresión génica de pacientes con GB con un mal pronóstico mostraron sobreexpresión de genes asociados con el linaje mesenquimal. Durante la progresión tumoral se produce la conmutación de caderinas, un proceso en donde la expresión E-caderina epitelial se conmuta a caderinas mesenquimales como N-caderina y caderina-11¹⁴⁹. La mayoría de GB no muestran expresión intrínseca de E-caderina, aunque se ha observado una pequeña subfracción de GB con expresión de E-caderina¹⁷⁸.

Los diferentes estudios realizados de microRNAs y los distintos perfiles de expresión de estos observados en glioblastomas, subrayan la importancia de los mismos en la patogénesis del tumor. Aún son escasos los estudios funcionales, sobre todo *in vitro*, que permitan esclarecer la importancia de los miRNAs en este tipo de neoplasias.

1.3.5 Utilización de la transfección en el estudio funcional de los miRNAs

La transfección se define como la introducción dentro de una célula eucariota de una molécula de DNA/RNA que no pertenece a la célula, mediante plásmidos, vectores víricos u otras herramientas para la transferencia.

Las técnicas de transfección celular han permitido en gran medida ampliar los conocimientos acerca de la regulación génica y de la función de las proteínas en los sistemas celulares. La introducción de una construcción de DNA recombinante en la que se ha situado una secuencia codificante de un gen reportero (luciferasa, proteínas fluorescentes, beta-galactosidasa, etc.) bajo una secuencia de regulación que se desea estudiar, permite medir con facilidad tasas de expresión génica en diferentes situaciones experimentales¹⁰².

Existen dos tipos principales de transfección: virales y no virales. La primera comprende el uso de retrovirus, adenovirus y lentivirus. Ellos ofrecen como ventaja la alta eficiencia de transfección, pero como inconveniente, la manipulación y producción de virus lo cual requiere fuertes y adecuadas medidas de seguridad de laboratorio; además los genes virales se introducen en el genoma de la célula y pueden causar efectos secundarios no deseados, o influir en el patrón de expresión de proteínas¹⁰².

Las técnicas de transfección no virales que se utilizan en la actualidad se pueden clasificar en dos tipos: métodos físicos o métodos químicos⁶².

Los métodos físicos están basados en la introducción mecánica de las moléculas en el interior de la célula. Entre ellos están:

- Microinyección directa. El DNA se microinyecta directamente al citosol, célula por célula.
- Electroporación. Introducción del DNA adherido a micropartículas que se disparan sobre las células, generalmente se lleva a cabo abriendo poros o "agujeros" transitorios en la membrana plasmática de las células.

Los métodos químicos están basados en la formación de complejos que las células son capaces de adquirir e incorporar, bien sea directamente

mediante la ruta endocítica o a través de membranas. Entre estos métodos podemos mencionar:

-Método del fosfato cálcico. Basado en la obtención de un precipitado entre el cloruro de calcio y el DNA. En esta situación coprecipitan formando unos agregados que son endocitados por las células. Aparentemente el agregado con calcio protege al DNA de la degradación por las nucleasas celulares.

- Método del DEAE dextrano. Basado en la obtención de complejos entre la resina DEAE y el DNA. Los polímeros de DEAE dextrano o polybreno tienen una carga que les permite unirse a las moléculas de DNA cargadas muy negativamente. El DNA acompañado se introduce en las células mediante choque osmótico mediante Dimetilsulfoxido (DMSO) o glicerol. El uso de DEAE dextrano se limita a las transfecciones transientes.

- Método de lipofección. Se basa en la formación de complejos entre lípidos catiónicos y DNA/RNA (miRNA). El complejo tiene afinidad por la membrana y permite la entrada del DNA en el citosol. Existe un gran número de lípidos que se emplean en lipofección, entre ellos lipofectamina, aunque existe una estructura consenso de un lípido catiónico sintético, a partir de la cual se han diseñado muchas variantes. Los parámetros a optimizar son la relación entre lípido y DNA/RNA (miRNA) (relación de cargas), la cantidad de DNA/RNA (miRNA) empleado, el tiempo que se exponen las células al complejo y la presencia o ausencia de suero.

Para la transfección de miRNAs se ha utilizado ampliamente el método de lipofección, ya que al ser estructuras pequeñas, este método es fácil y eficiente y de menor coste para introducir este material en las células. Los reactivos de lipofección en especial la lipofectamine se han optimizado para la eficiencia, viabilidad y reproducibilidad. Desde su lanzamiento en 1993, reactivos Lipofectamine® se han convertido en los reactivos de transfección más referenciados con más de 50.000 análisis¹⁸⁴.

En estudios de transfección de miRNAs en células de GB, la lipofección y el uso de lipofectamine ha sido el método más utilizado. Estos trabajos se han realizado en líneas celulares, donde se ha estudiado el miR-21 como factor antiapoptótico⁴⁷; o el miR-128 como un inhibidor de la proliferación celular y del crecimiento de tumores en xenotrasplantes⁹⁵. Así mismo, los estudios de sobreexpresión e inhibición de miR-130a lo han

identificado como un candidato para predecir la respuesta al tratamiento con temozolomida en pacientes con glioblastoma ⁵⁰.

Hay una necesidad clara y urgente de comprender mejor los mecanismos que subyacen en la patogénesis del GB. Los miRNAs representan un conjunto de nuevas y emergentes moléculas que juegan un importante papel epigenético regulador de numerosos procesos celulares asociados con el cáncer. Una mejor comprensión de las funciones de estas moléculas puede dar como resultado el desarrollo de nuevas estrategias de diagnóstico, pronóstico y tratamiento en el GB.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El glioblastoma, es una de las neoplasias más agresivas del organismo. Dentro de ellas se consideran dos grandes variantes, el glioblastoma primario o *de novo*, con el gen *IDH* no mutado, y el glioblastoma secundario, con antecedentes de un astrocitoma, y con el *IDH* mutado. Esta entidad se presenta como un paradigma de la heterogeneidad en las neoplasias, que expresa su variabilidad en la presentación clínica, en los patrones neuropatológicos y en los genéticos, tanto entre tumores como dentro del mismo tumor. Su localización en el cerebro, su potencial infiltrativo, su inducción de angiogénesis, son causa de su alta capacidad destructiva y funcionalmente invalidante. Esta agresividad biológica ligada a la mala respuesta a las diferentes acciones terapéuticas, conduce al paciente a una evolución fatal.

Uno de los comportamientos biológicos más agresivos del glioblastoma es la infiltración de estructuras adyacentes. Este proceso, ligado con alteraciones en el reconocimiento celular, en las uniones intercelulares y en el movimiento, es conocido genéricamente dentro de los procesos oncogénicos, como EMT (Transición Epitelio -Mesenquimal), mecanismo que, con sus características particulares, es conocido en el GB como MMMI (Modo Mesenquimal de Migración e Invasión). Este proceso presenta alteraciones genéticas y epigenéticas que provocan una importante desregulación en la función génica y en las vías de señalización, ligadas a estos procesos.

La amplificación y/o mutación de *EGFR* es la alteración molecular más frecuente en el GB, de ahí el interés de estudiar el estatus de este gen según el patrón de amplificación, y analizar los perfiles de las alteraciones genéticas asociados. En este contexto, los miRNA, directamente implicados en los procesos de regulación de la expresión génica, se presentan como importantes actores en la modulación epigenética de los procesos neoplásicos. La alteración de este sistema afecta a un número importante de miRNA provocando una alteración en la expresión de genes implicados en vías de señalización dependientes de EGFR, y en diferentes procesos neoplásicos, como la infiltración tumoral.

La familia miR-200 está implicada en los procesos de EMT en diferentes neoplasias. En el caso del GB, los trabajos sobre miR-200 son incipientes. Nuestros estudios previos aportan datos de una importante desregulación del miR-200c en GB primarios. Esta alteración podría estar relacionada con el proceso MMMI, a través de su acción moduladora en la expresión de ZEB1 y CDH1, directamente implicados en procesos de migración celular.

Es de interés determinar la posible relación, directa o indirecta de la acción moduladora de miR-200c con los patrones de amplificación de *EGFR* y los mecanismos de infiltración en el GB. Ello nos lleva a plantear un estudio sobre tumores primitivos de GB caracterizando sus patrones clínicos y neuropatológicos, agrupándolos según el patrón de amplificación de *EGFR*. Se realizará el análisis de los perfiles de alteraciones génicas y de miRNAs en los diferentes grupos y su repercusión en las vías de señalización ligadas a EGFR. Asimismo, se analizará el comportamiento de miR-200c como modulador de los mecanismos de infiltración/migración en los diferentes grupos de GB. El análisis de la acción de miR-200c, su relación con EGFR y su acción moduladora de los procesos MMMI, en concreto sobre la migración *in vitro*, se plantearán sobre un modelo experimental de transfección de miR-200c sobre líneas celulares y cultivos primarios de GB, representativos de los diferentes patrones de amplificación de *EGFR*.

Los objetivos derivados de este planteamiento se detallan a continuación.

OBJETIVOS

1. Realizar el estudio clínico e histopatológico protocolizado de 46 pacientes de GB primarios, *IDH* no mutado, con particular atención a los patrones nodular y/o difuso mediante criterios radiológicos/neuropatológicos.
2. Definir subgrupos de GB primarios, en relación al estatus de amplificación y expresión de *EGFR*, y determinar su relación con las características clínicas e histopatológicas.
3. Analizar perfiles genéticos entre los tres grupos de GBs, analizando la variación en el número de copias, mutaciones, y cambios en los patrones de metilación; estudiando su implicación en las vías de señalización dependientes de *EGFR*.
4. Analizar los perfiles de miRNAs de los tres grupos de tumores primarios de GB según el nivel de amplificación de *EGFR*.
5. Determinar la alteración en la expresión del miR-200c en tumores primitivos, en los grupos de amplificación de *EGFR*, y su comportamiento con respecto a sus dianas ZEB1 y CDH1. Establecer su posible relación con los patrones de infiltración tumoral.
6. Diseñar un modelo experimental de cultivos celulares primarios y líneas celulares, caracterizados detalladamente tanto a nivel morfológico como genético, representando los distintos niveles de amplificación de *EGFR*.
7. Analizar mediante este modelo experimental el comportamiento de la expresión de miR-200c, y sus dianas ZEB1 y CDH1 en relación con la amplificación de *EGFR*.
8. Estudiar mediante transfección celular, en el modelo experimental, el comportamiento de la expresión de miR-200c y sus dianas, en situaciones de inhibición y sobreexpresión valorando su posible implicación en la MMMI.
9. Estudiar la capacidad migratoria de las células en los cultivos celulares sometidas a modificaciones en la expresión del miR-200c, valorando la importancia de este miRNA en el modelo de migración e invasión de las células del GB.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

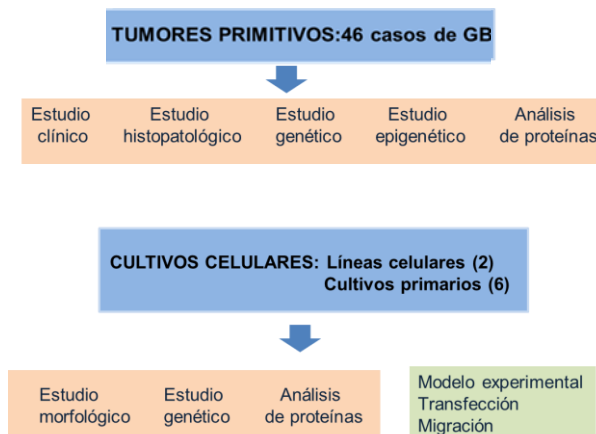
El presente trabajo aborda el estudio clínico, morfológico, inmunohistoquímico, genético y epigenético (miRNAs) del glioblastoma. El trabajo se plantea en un doble aspecto; una fase en la que se estudia las características de los tumores primitivos, y una segunda fase en la que se ha diseñado un modelo experimental para el estudio del comportamiento del miR-200c, y su implicación en la migración celular.

En la primera fase se han estudiado 46 casos de pacientes afectados por GB primarios, *IDH* negativo, tratados en el Servicio de Neurocirugía, y diagnosticados en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Se ha realizado un estudio clínico de los pacientes, y una caracterización histopatológica y genética de los tumores. Así mismo, sobre las muestras se ha realizado un análisis epigenético que incluye un estudio de miRNAs.

En la segunda fase se ha analizado sobre un diseño experimental, la actuación del miRNA-200c, y su relación con la amplificación de *EGFR*, gen diferenciador de los grupos planteados en el estudio. Para ello se han utilizado seis cultivos primarios de glioblastoma obtenidos en nuestro laboratorio a partir de las muestras biópsicas de los tumores estudiados, y dos líneas celulares de GB establecidas y comercializadas por la ATCC: U-87 (MG ATCC® HTB-14) y U-118 (MG ATCC® HTB-15).

Este estudio ha sido aprobado por el Comité Institucional de Ética de la Universidad de Valencia y la Fundación del Hospital Clínico de Valencia (INCLIVA).

Para este trabajo se han utilizado diferentes técnicas metodológicas que describiremos en apartados sucesivos.



3.1 Estudio clínico de los pacientes

Se realizó el estudio clínico de 46 pacientes, basándonos en el análisis de sus historias clínicas depositadas en el Archivo Central del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Se han valorado los siguientes parámetros:

- Sexo del paciente.
- Edad del paciente en el momento de realizar el diagnóstico.
- Síntoma inicial. Duración del síntoma inicial (DSI) que establece el tiempo transcurrido entre el momento de la primera manifestación clínica y el diagnóstico del tumor.
 - La localización y el tamaño del tumor obtenidos mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN).
 - El índice de Karnofsky que hace referencia al estado físico del paciente en el momento del diagnóstico.
 - El tipo de cirugía, que puede ser resección parcial o total del tumor.
 - El tratamiento adyuvante: radioterapia y quimioterapia.
 - La supervivencia del paciente, que indica el tiempo transcurrido entre el día del diagnóstico y el día del exitus.

3.2 Caracterización de los tumores primitivos

En primer lugar las biopsias tumorales fueron analizadas macroscópicamente, y se seleccionó parte de la muestra para establecer el diagnóstico mediante el estudio histopatológico e inmunohistoquímico. El resto de la muestra fue segmentada en siete fragmentos de 1 mm de diámetro y 20 mg aproximadamente. Se seleccionó un fragmento de aproximadamente 1 mm³ (material fresco) para la realización de cultivos celulares. Las muestras fueron identificadas y almacenadas en estado de criopreservación a -80 °C. Los fragmentos criopreservados fueron empleados para estudios moleculares, genéticos, epigenéticos y para la extracción de proteínas.

3.2.1 Estudio histopatológico

Para el análisis histológico, las muestras del tejido tumoral fueron fijadas en formaldehído al 10%, incluidas en bloques de parafina, cortadas en secciones de 5 micras, montadas en portaobjetos con Poly-L-lisina y teñidas con hematoxilina eosina.

La identificación y clasificación del tumor se realizó en base al estudio histopatológico, aplicando los criterios establecidos en 2016 por la OMS ¹⁹¹.

Los criterios morfológicos que se utilizaron para la identificación fueron: patrón celular, patrón de organización, densidad celular, hiperplasia vascular y necrosis. Además de estos criterios, fueron considerados los patrones astrocitario, gemistocítico, oligodendrogial, célula pequeña, anaplásico, morfología fusiforme e indiferenciada, como patrones celulares mayoritarios.

3.2.2 Construcción de matrices tisulares (TMA)

Para abordar mejor la caracterización de las muestras tumorales de los casos de este estudio, una vez establecido el diagnóstico, se elaboraron matrices tisulares (TMA) que se construyeron de la siguiente manera: se seleccionaron los bloques de parafina de cada una de las muestras y se realizaron 4 cilindros de un diámetro 0,8 mm correspondientes a dos zonas seleccionadas del tumor, descartándose áreas de necrosis o muestra no neoplásica. Se utilizaron como control 2 punch de tejido de placenta, hígado y/o músculo. Los punch se realizaron con el instrumento Beecher Tissue Arrays siguiendo las instrucciones del *Beecher Instruments Manual Tissue Arrayser I* (Figura 14).

Estas matrices nos permitieron el estudio de un conjunto de casos a la vez, y en un espacio muy reducido. Los TMAs proporcionan un método de alto rendimiento para estudiar el perfil molecular, la expresión inmunohistoquímica o el análisis de las alteraciones cromosómicas mediante hibridación *in situ*, de múltiples muestras de tejido simultáneamente.

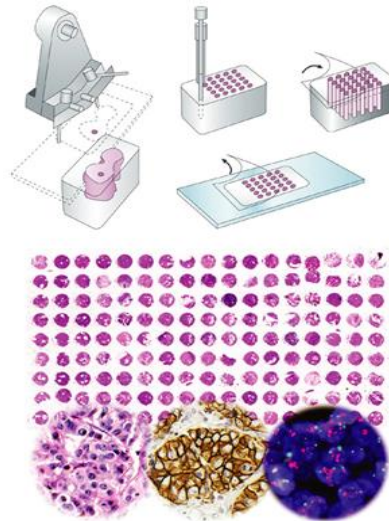


Figura 14. Construcción de las matrices tisulares (*Nature Reviews Drug Discovery*).

3.2.3 Estudio inmunohistoquímico

Para el estudio inmunohistoquímico se utilizó la técnica de la avidina-biotina-peroxidasa, con algunas modificaciones. El estudio se realizó en secciones de 5 micras de las matrices tisulares elaboradas con los casos del estudio. Los anticuerpos utilizados en el estudio fueron: GFAP, Ki-67, EGFR, CD34 y p53 (Dako, Glostrup, Denmark) que se detallan en la tabla 5.

Tabla 5. Anticuerpos utilizados en inmunohistoquímica.

Anticuerpo	Dilución	Casa	Monoclonal/policlonal
GFAP	1/500	Dako	policlonal
Ki-67/MIB-1	1/200	Dako	monoclonal
EGFR	1/50	Dako	monoclonal
CD34	Pre-diluido	Dako	monoclonal
p53	Pre-diluido	Dako	policlonal
ZEB1	1/500	Sigma	policlonal

El protocolo desarrollado fue el siguiente:

- Desparafinar las secciones en estufa (60 °C), pretratamiento con xilol (3 pasos) y alcoholes graduales (90 °, 80 °, 70 °). Lavar con agua destilada.
- Tratar con autoclave (anticuerpos GFAP y Ki67/MIB-1) o por digestión enzimática (EGFR) para producir el desenmascaramiento antigénico, en tampón citrato (1/10) 3 minutos, o tampón de pH alto o pH bajo según corresponda, a 1,5 atm.
- Inhibir la actividad peroxidasa endógena (metanol + H₂O₂ 3%). Lavar.
- Cerclear las preparaciones con sigmacote rodeando el corte, para la retención de líquidos.
- Bloquear la actividad inespecífica del colágeno con suero bobino fetal (FBS) al 20%.
- Cubrir los cortes con el anticuerpo primario diluido en FBS o diluyente comercializado. Incubación de 45 minutos a una hora.
- Lavar tres veces con Tampón Fosfato Salino (PBS) (Gibco BRL, Grand Island, New York).
- Cubrir los cortes con visualización en visión (Dako). Incubación 30 minutos.
- Lavar con PBS.
- Revelar con cromógeno comercial (Dako). Lavar en agua corriente.
- Contrastar con hematoxilina de Harris, 30 segundos.
- Deshidratar con alcoholes graduales (70°, 80°, 90°) y xiloles.
- Montar los cubreobjetos con entellan.

Para los diferentes estudios inmunohistoquímicos se utilizaron como control positivo muestras de probada reactividad frente a los distintos anticuerpos y como control negativo se omitió el uso del anticuerpo primario que fue sustituido por PBS.

Para la valoración de la expresión de GFAP se valoró como negativa (0) o positiva (1, 2 y 3) en relación con la diferente porcentajes de expresión en las células.

La valoración de Ki-67/MIB-1 se realizó utilizando un fotomicroscopio LEICA DMD108 donde se obtuvieron fotos a 40X de toda la muestra y posteriormente se utilizó el programa Image Tool (Versión 0.8.1 Beta),

consistente en un sistema comparativo que permite valorar el número de células positivas por área y permite estudiar el grado de agrupación y proliferación de cada muestra en un área de 1mm².

Para el estudio de EGFR se utilizó un microscopio LEICA DM2500 y se realizó la valoración de la cantidad de células teñidas: 0 (tinción negativa), 1 (focal), 2 (moderada), y 3 (abundante)²⁵⁵. Cuando la valoración fue de 2 ó 3, se consideró que existía sobreexpresión.

Para estudiar la expresión de p53 se cuantificaron los núcleos marcados positivos en cuatro valores de expresión de la proteína cuando la cantidad de núcleos marcados era <10 % del total valor 0, cuando estaba entre 10-30 valor 1, entre 30-50 valor 2, entre 50-75 valor 3, y para > 75 valor 4.

3.2.4 Estudios genéticos y epigenéticos

Las diferentes metodologías se utilizaron tanto para la caracterización de los tumores primitivos, como para los cultivos celulares, según los objetivos a estudiar.

3.2.4.1 Análisis de Hibridación in situ de fluorescencia (FISH)

El análisis de FISH se realizó en las diferentes TMA de las muestras tumorales. Se utilizaron como controles preparaciones de hígado y placenta. Se utilizó la sonda EGFR/CEP7 (Kreatech Diagnostic, Amsterdam, Netherlands) para la detección del gen *EGFR* y el centrómero del cromosoma 7 (CEP 7), el locus utilizado de control. Las áreas en las que se realizó el estudio, previamente fueron teñidas con HE para verificar la presencia de células tumorales.

La técnica de FISH consta de varias etapas que se detallan en la figura 15.

El procedimiento realizado ha sido el siguiente:

- Colocar las preparaciones en estufa a 60 °C durante 30-60 minutos, para desparafinar las muestras.
- Rehidratación y desparafinización de las muestras en xilol 5 minutos y etanol 70%, 85% y absoluto durante 2 minutos.

- Pretratamiento con tampón comercial diluido a 95-99 °C durante 10 minutos. Secar a temperatura ambiente 15 minutos. Lavar con tampón de lavado comercial 3 minutos, y retirar el exceso de tampón de lavado que quede alrededor del tejido.
- Digestión y tratamiento con pepsina (250 µl) durante 6 minutos a 37 °C en el hibridador. Lavar 3 minutos.
- Deshidratación en etanoles 70%, 85% y 100% durante 2 minutos. Secar las preparaciones durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Dispensar 10 µl de sonda por área, cubrir el portaobjetos y sellar con cubre y pegamento.
- Hibridación: programa del hibridador: 5 minutos de desnaturalización a 82 °C e hibridación 20 horas a 45 °C.
- Lavado post-hibridación: retirar los cubreobjetos y lavar con tampón de astringencia durante 5 minutos a temperatura ambiente sin agitación y luego 10 minutos lavar con tampón de astringencia a 65 °C.
- Deshidratación en etanoles 70%, 85% y 100% durante 2 minutos. Secar las preparaciones durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Revelado: aplicar 10 µl de DAPI/Antifade (concentración final 0,02 µg/ml) y cubrir.

La valoración de los resultados de FISH se han realizado en las siguientes condiciones: Las señales fluorescentes se evaluaron utilizando un fotomicroscopio Leica DFC 340FX con filtros adecuados. En los estudios se evaluaron alrededor de 100 núcleos de las células del tumor que no se solapaban en las secciones de parafina, valorando las 4 muestras por tumor presentes en el TMA. Se valoraron las señales rojas que marcan el gen *EGFR* y la señal verde el centrómero del cromosoma 7. Se calculó el número de señales para el gen *EGFR* y el CEP 7 en cada caso, seguido del cálculo de la ratio *EGFR*/CEP 7.

El gen *EGFR* se consideró amplificado cuando la relación *EGFR*/CEP 7 fue mayor de 2. El grado de amplificación se valoró como 1, 2 y 3 según el porcentaje de núcleos amplificados ($\leq 15\%$, 30%-60%, $\geq 60\%$ respectivamente) ¹⁷⁰.

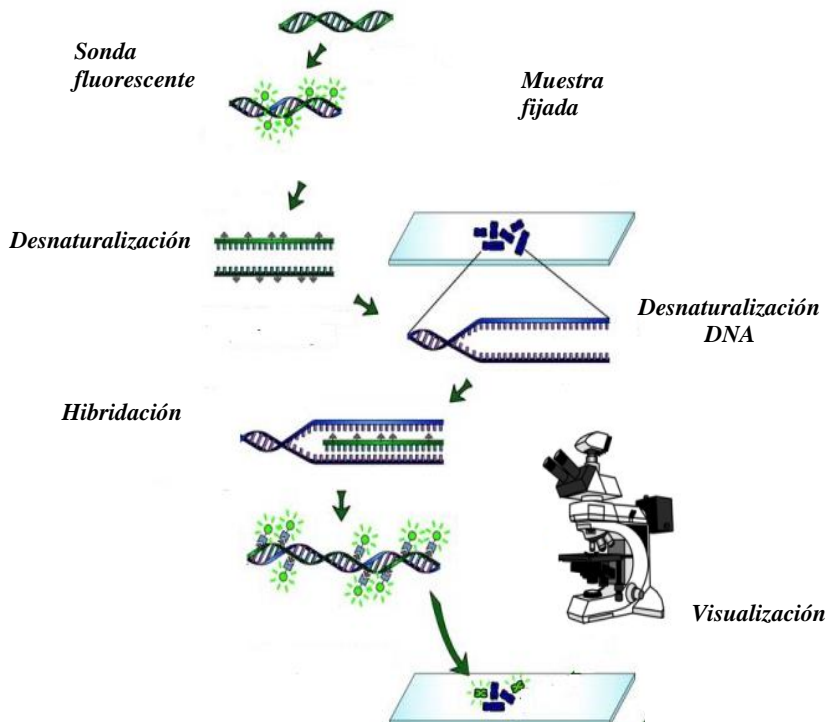


Figura 15. Etapas de la Hibridación in situ de fluorescencia (FISH). (www.lookfordiagnosis.com) modificada.

3.2.4.2 Extracción y aislamiento de DNA

La extracción de DNA se realizó a partir de muestras criopreservadas a -80°C de 1mm de diámetro y se utilizó QIAamp DNA Mini kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, MA, USA).

Para la extracción de DNA de tejido se siguió el protocolo recomendado por el fabricante que puede resumirse en los siguientes pasos:

- Disgregación del tejido. Se cortaron en pequeños fragmentos hasta 20 mg aproximadamente, sobre una placa Petri usando un bisturí, a temperatura ambiente para favorecer la lisis celular.

- Lisis. Se añadieron 180 µl de tampón ATL a un tubo de centrifuga de 1,5 ml conteniendo el tejido previamente seccionado.
- Digestión. Se añadieron 20 µl de proteinasa K, se agitaron por vortex e incubación a 56 °C, durante toda la noche.
- Se añadió 200 µl de tampón AL a la muestra, agitación por vortex 15 segundos e incubación 10 minutos a 70 °C.
- Se añadió 200 µl de etanol 100%, y se realizó agitación por vortex 15 segundos.
- Retención del DNA. Se transfirió la mezcla anterior a una columna de sílica-gel (QIAamp spin column), se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto y se eliminó el eluyente.
- Lavados. Se añadieron 500 µl del tampón AW1 y se centrifugó a máxima velocidad (14 000 rpm) durante 1 minuto desechando el eluyente. Se añadieron 500 µl del tampón AW2 y se centrifugó a máxima velocidad (14 000 rpm) durante 3 minutos desechándose el eluyente. Se repitió la centrifugación de 1 minuto para precipitar cualquier resto de solución de lavado.
- Elución del DNA. Se añadieron 80 µl de tampón TE low. Se añadieron en dos partes. Primero 40 µl, se incubaron durante 2 minutos y se centrifugó a 10 000 rpm durante 1 minuto, este paso se repitió hasta completar el volumen final de 80 µl.

3.2.4.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación del oncogén *EGFR* se determinó mediante PCR diferencial. Como control positivo se tomó un caso de tumor de mama con amplificación. Como control negativo se utilizaron muestras de tejido normal de corteza cerebral. La intensidad de las bandas correspondientes a la amplificación de *EGFR* y al control interno, interferón (*IFN*), se analizaron con ayuda del programa Image J. Si la banda de *EGFR* presentaba una intensidad de al menos 1,5 veces superior a la del *IFN*, se consideró que la muestra estaba amplificada.

Para realizar la PCR se utilizaron 200 ng de DNA (1 µl de volumen) por cada muestra. Se utilizaron los reactivos y secuencias de primers de los exones de *EGFR* e interferón que se detallan a continuación, para un

volumen final de 25 μ M. Se utilizó Ampli Taq Gold® PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) (Tabla 6).

Tabla 6. Reactivos utilizados en la PCR diferencial.

Reactivos	Volumen (μ l)	Primers	Secuencia
EGFR 110DR (15 μ M)	1	EGFR 110DR	AAAGGAATGCAACTTCCCAA
EGFR 110DF (15 μ M)	1	EGFR 110DF	AGCCATGCCCGCATTAGCTC
INF 150 DR (15 μ M)	1	INF 150DR	CTGGGATGCTCTTCGACCTC
INF 150 DF (15 μ M)	1	INF 150DF	TCTTTTCTTTCCCGATAGGT
AmpliTaq Gold® PCR Master Mix	12,5		
H ₂ O	7,5		

Programa del termociclador: La PCR consistió en una primera etapa de desnaturalización a 94°C/5 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización 94 °C /1 minuto, hibridación 50 °C /1 minuto y elongación 72 °C /1 minuto. Finalmente una etapa de elongación final 72 °C/10 minutos.

Condiciones de electroforesis: Para comprobar la amplificación se realizó una electroforesis de los productos amplificados (10 μ l del producto de la PCR + 4 μ l del tampón de carga), en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio y se aplicó un voltaje de 120 V/cm aproximadamente 35 min. Se utilizó un Track1 100 bp DNA Ladder, (Invitrogen), como marcador del tamaño de los fragmentos de DNA amplificado. Se fotografió sobre un transiluminador de luz UV.

3.2.4.4 Amplificación de sondas dependientes de ligandos múltiples (MLPA) y amplificación de sondas dependientes de ligandos múltiples metilación específica (MS-MLPA)

La amplificación de sondas dependientes de ligandos múltiples (MLPA) y la amplificación de sondas dependientes de ligandos múltiples metilación específica (MS-MLPA) se usaron para determinar el número de copias y el estado de metilación respectivamente, de hasta 50 secuencias de DNA en una PCR múltiple y única. Las MLPA y MS-MLPA consta de cuatro fases que son: desnaturalización del DNA, reacción de hibridación, reacción de ligación- digestión y PCR. La duración total de la técnica fue de 48 horas. Estas fases están representadas en la figura 16.

Los kits utilizados fueron:

- **Salsa MLPA KIT P105-D1 Gliomas-2.** El kit contiene 55 sondas para MLPA con productos de amplificados de 126 a 500 nt. También tiene 9 controles que generan fragmentos de 120 nt. Este estudio puede determinar la variación en el número de copias de los siguientes genes: *EGFR* (7p11.2), *PTEN* (10q23.31), *CDKN2A* (9p21.3), *TP53* (17p13.1), *PDGFRA* (4q12), *NFKBIA* (14q13.2), *CDK4*, *MIR26* y *MDM2* localizados en la región (12q14-q15). También detecta la presencia de la mutación de *EGFR* conocida como la variante *EGFRvIII*. La descripción detallada de las sondas del kit que hemos estudiado se muestran en la tabla 1 del Apéndice I.

- **Salsa MLPA KIT ME001-C2 Tumor suppressor -1.** El kit contiene 26 sondas para MS-MLPA correspondientes a 24 genes supresores de tumores que generan productos de amplificación de 136 a 483 nt. Los genes que se estudiaron fueron: *TIMP3* (10p12.1), *APC* (5q22.2), *CDKN2A* (9p21.3), *CDKN2B* (9p21.3), *MLH1* (3p22.2), *ATM* (11q22.3), *RARB* (3p24.2), *HIC1* (17p13.3), *CHFR* (12q24.33), *BRCA1* (17q21.31), *CASP8* (2q33.1), *CDKN1B* (12p13.1), *KLLN* (10q.23.3), *BRCA2* (13q12.3), *CD44* (11p13), *RASSF1* (3p21.31), *DAPK1* (9q21.33), *VHL* (3p25.3), *ESR1* (6q25.1), *RASSF1* (3p21.31), *TP73* (1p36.32), *FHIT* (3p14.2),

IGSF4 (11q23.3), *CDH13* (16q23.3), *GSTP1*(11q13.2), *MLH1*(3p22.2). También consta de 15 pruebas de referencia. En el análisis se obtiene la variación en el número de copias de estos genes, y el estudio de la metilación. La descripción detallada de las sondas del kit que hemos utilizados se muestran en la tabla 2 de los Apéndice I.

Reacción de ligación-digestión MLPA

Para está técnica se siguió el protocolo recomendado por el fabricante (MRC-Holland). Para el estudio por MLPA se usaron 200 ng de DNA en 5µl de tampón Tris-EDTA (TE) y como control solo TE.

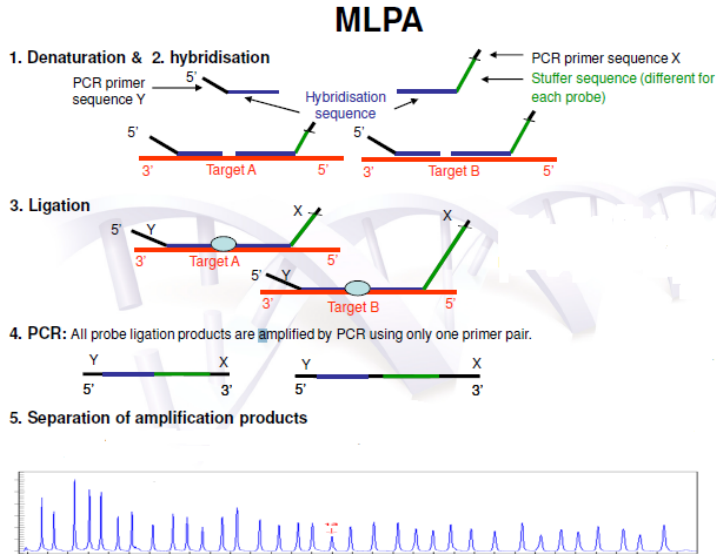
- Día 1. Desnaturalización. Poner los tubos de PCR en el termociclador (AB Aplid Biosystem 2720) y comenzar el programa: 5 minutos a 98°C y luego enfriar hasta 25 °C.
- Día 1. Reacción de Hibridación. Preparar la mezcla a razón 1:1 que contiene 1,5µl de tampón MLPA y 1,5µl la probemix. Aplicar el vortex para mezclar bien y añadir 3µl de la mezcla de hibridación a cada tubo. Continuar con el programa 1 minuto a 95 °C y posteriormente hibridación a 60 °C durante 16-20 horas.
- Día 2. Reacción de ligación. Preparar la mezcla, previamente se aplica el vortex a las ligasas A y B. La mezcla contiene 3µl ligasa 65- tampón A, 3µl ligasa 65- tampón B y 25µl H₂O_d. Mezclar bien mediante pipeteo o utilizando el vortex y mantener en hielo. Añadir a la mezcla 1µl de la enzima ligasa-65 tampón A .Continuar con el programa del termociclador, cuando las muestras están a 54 °C se añaden 32µl de la mezcla de ligación a cada tubo sin sacarlo del termociclador; pipetear bien para lograr que esté homogénea la mezcla. Continuar con el programa: 15 minutos a 54 °C, 5 minutos a 98 °C y enfriar hasta 15 °C.

Reacción de ligación-digestión (MS-MLPA, ME001-C2) para metilación

- Día 1. Preparar la mezcla ligasa-65: 8,25 μl de H_2O_d + 1,5 μl ligasa 65- tampón B. Añadir a la mezcla 0,25 μl de la enzima ligasa-65 tampón A homogenizar bien la mezcla. Por otro lado se prepara la mezcla de ligación-digestión: 7,75 μl de H_2O_d + 1,5 μl ligasa 65- tampón B. Añadir a la mezcla 0,25 μl de la enzima Ligase-65 tampón A y 0,5 μl de la enzima HhaI (Promega Biotech Ibérica, SL, Madrid, España), homogenizar bien la mezcla. Remover los tubos del termociclador y añadir 3 μl de ligasa tampón A y 10 μl de H_2O a cada tubo. Mezclar mediante pipeteo y pasar 10 μl a un segundo tubo. Poner los tubos en el termociclador, continuar con el programa a 48 °C en forma de pausa. Añadir 10 μl de la mezcla de la ligasa-65 al primer tubo que será para el número de copias, y añadir 10 μl de mezcla de ligación-digestión al segundo tubo que será para la metilación. Continuar con el programa 30 minutos a 48 °C y 5 minutos a 98 °C. Después enfriar hasta 20 °C.
 - Día 2. PCR. Vortex a la SALSA PCR primero y calentar con los dedos durante 10 segundos la polimerasa para reducir la viscosidad. Preparar una mezcla con: 3,75 μl H_2O_d + 1 μl SALSA PCR+ 0,25 μl de polimerasa. Pipetear la mezcla y mantener en hielo. A temperatura ambiente añadir 5 μl de la mezcla de PCR a cada tubo, mezclar mediante pipeteo. Continuar con el programa del termociclador: 35 ciclos (30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C, 60 segundos a 72 °C, y finalizar con 20 minutos a 72 °C enfriando a 15 °C.

Posteriormente, se preparan las muestras que pasarán por el secuenciador ABI PRISM 310, para el análisis de fragmentos, para observar el número de copias de un gen y la metilación del mismo. Para ello, se prepara una mezcla de 0,75 μl H_2O_d + 0,4 μl de LIZ + 13,5 μl de formamida. Se añaden 14,65 μl de la mezcla en cada tubo y luego se añade 1 μl de la PCR resultante de la MLPA.

A



B

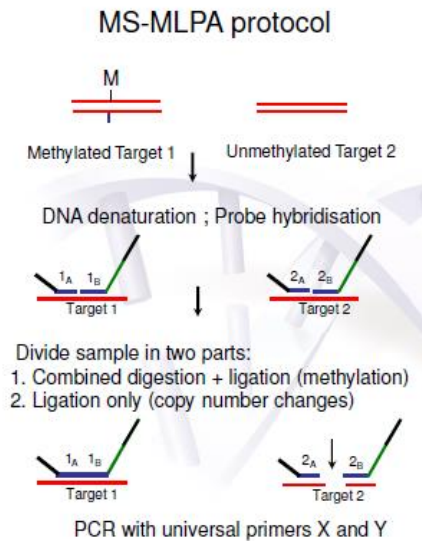


Figura 16. Etapas de la MLPA: A) Amplificación de sondas dependientes de ligandos múltiples (MLPA) y B) Amplificación de sondas dependientes de ligandos múltiples metilación específica (MS-MLPA). Protocolos MRC-Holland, www.mlpa.com)

Obtención, interpretación y análisis de resultados por MLPA

Se seleccionaron aquellas lecturas de las muestras que pasaron la evaluación de calidad, y se repitieron aquellas que no tuvieron la calidad requerida para ser analizada, usando el software de análisis de datos Coffalyser.net (MRC-Holland).

Para determinar el número de copias se comparan las muestras sin digerir y se normaliza los datos de dos formas; con la misma muestra y entre todas las muestras.

Para interpretar los resultados del número de copias estudiamos el DQ (Dosage Quotient) que es el cociente entre la constante de normalización NC del número de pruebas n sin digerir entre la constante de normalización NC por prueba en muestras de referencia no digeridas. Este cociente (DQ) puede indicarnos cuando hay una delección o duplicación de los diferentes genes estudiados.

Como criterio de la fiabilidad del análisis se sigue que, la desviación estándar de todas las pruebas de referencia sea $\leq 0,10$ y la DQ esté entre 0,8-1,3 para el estatus normal del gen. Para el análisis de los resultados seguimos los siguientes criterios en relación al parámetro DQ, según el fabricante y adaptado según la experiencia en el análisis alcanzado por nuestro grupo de investigación:

- h: alto número de copias ($>2,9$). Corresponde a una amplificación del gen.
- l: aumento bajo en el número de copias (1,3-2,9). Corresponde a ganancia.
- n: estatus normal del gen (0,8-1,3).
- HMZ: delección homocigótica (0-0,3).
- LOH: delección heterocigótica (0,3-0,7/ 0,8).

Para determinar el estatus de metilación se comparó el patrón de picos de la muestra sin digerir con su contraparte digerida. El porcentaje de metilación se calculó aplicando el cociente entre la constante de normalización NC del número de pruebas n digeridas y la constante de normalización NC por prueba en muestras de referencia no digeridas, multiplicado por 100.

Como criterio de la fiabilidad del análisis se controla que los DQ de las pruebas de referencia de todas las muestras digeridas debe estar entre 0,7-1,3 según el manual del fabricante.

3.2.4.5 Secuenciación de *IDH1/IDH2* y *TP53*

La secuenciación de *IDH1* y de *IDH2* se realizó utilizando los cebadores de las regiones genómicas R132 de *IDH1* correspondiente al exón 4 y R172 de *IDH2* correspondiente al exón 4 (Tabla 7), siguiendo el protocolo descrito por Hartmann en 2009 ¹⁰⁷.

Tabla 7. Cebadores utilizados para la secuenciación de *IDH1* y de *IDH2*.

<i>Cebador</i>	<i>Secuencia</i>
IDH1-4F	CGGTCTTCAGAGAAGCCATT
IDH1-4R	GCAAATCACATTATTGCCAAC
IDH2-4F	AGCCCAT CATCTGCAAA AAC
IDH2-4R	CTAGGCGAGGAGCTCCAGT

El termociclador se programó según lo indicado a continuación

95 °C	10 min	} 36 ciclos
95 °C	30 seg	
56 °C	45 seg	
72 °C	45 seg	
72 °C	10 min	

La secuenciación de *TP53* se realizó utilizando los cebadores para amplificar los exones 5, 6, 7 y 8. Los *primers* utilizados para amplificar los distintos exones a secuenciar se detallan en la tabla 8. Los segmentos a secuenciar tienen una longitud entre 134 y 332 pb.

Tabla 8. Cebadores utilizados para secuenciar el gen *TP53*

<i>Cebador</i>	Secuencia
P53-5R	CAACCAGCCCTGTCGTCTCT
P53-5F	CTGACTTTCAACTCTGTCTC
P53-6R	GGCCACTGACAACCACCCTTAACC
P53-6F	CTCTGATTCCTCACTGATTG
P53-7R	AGTGTGCAGGGTGGCAAGTG
P53-7F	CTCATCTTGGGCCTGTGTTA
P53-8R	ACCTGATTTCTTACTGCCTCTGGC
P53-8F	GTCCTGCTTGCTTACCTCGCTTAGT

La programación del termociclador de los exones a estudiar fue la siguiente:

<u>Exón 5</u>		
95 °C	1min	} 35 ciclos
55 °C	1min	
72 °C	1min	

<u>Exón 6, 7</u>		
94 °C	45 seg	} 35 ciclos
58 °C	1 min	
72 °C	1min	

<u>Exón 8</u>		
95 °C	1 min	} 33 ciclos
62 °C	1 min	
72 °C	1min 30seg	

El protocolo utilizado se dividió en varias etapas:

PCR. Se utilizaron 100 ng/ μ l de DNA de todas las muestras. Los diferentes componentes de la PCR se utilizaron en las cantidades que muestra la tabla 9.

Tabla 9. Componentes de la PCR

Componentes	Volumen (μ l)
H ₂ O	17,6
Tampón PCR 10x	2,5
MgCl ₂	2
dNTP's	0,5
Forward Primer	0,5
Reverse Primer	0,5
Taqman polimerasa (U/ μ l)	0,3

Electroforesis. Los productos de PCR obtenidos se corrieron en un gel de agarosa al 2%. El gel de agarosa se preparó utilizando 2g de agarosa (Pronadisa, Sevilla, España) en 100 ml de tampón TBE 0,5X. Se añadió la solución RedSafe™ Nucleic Acid Standing, para detectar ácidos nucleicos en geles de agarosa. Para cargar las muestras se utilizó el azul de bromofenol y un marcador de peso molecular (Invitrogen). Se cargaron las muestras en el gel y éstas corrieron a 120V durante 30 minutos aproximadamente. Se reveló el gel de agarosa en un transiluminador de luz UV. Debe aparecer en la imagen las bandas limpias aproximadamente a 180 bp.

Purificación del DNA producto de la PCR. Para ello se añadió 5 μ l del tubo de PCR de cada muestra + 1 μ l de enzima USB ExoSAP-IT PCR) y se incubaron a 37 °C 15 minutos, y 80 °C 15 minutos.

BIG DYE. Se mantienen todos los reactivos en hielo. Se realiza una mezcla según lo indicado en la tabla 10.

Tabla 10. Componentes de la reacción BIG DYE

Componentes	Volumen (µl)
Enzima Big Dye	0,5
5X	1,5
Primer (3,2 µM)	1
H ₂ O	5,5
ADN (purificado)	1,5
Total	10

Programación del termociclador según lo indicado a continuación

96 °C	1 min	} 35 ciclos
96 °C	10 seg	
55 °C	5 seg	
60 °C	4 min	
4 °C	7 min	
4 °C	-	

Purificación de la secuenciación. Centrifugar las columnas durante 3 minutos a 850 g. Spin a las muestras de la Big Dye que se vayan a secuenciar. Tomar 10 µl de la muestra y añadir a las columnas (Performa DTR Gel Filtration Cartridges EDGE BIO). Centrifugar a 850 g durante 3 minutos.

Desnaturalización. Poner 5 µl de la muestra procedente de las columnas y 20 µl de formamida. Spin e incubación 5 minutos a 95 °C y 5 minutos en hielo.

Secuenciación. Se cargan las muestras en el secuenciador ABI PRISM 310, que previamente habrá sido montado con el capilar 310 GENETIC ANALYZER CAPILARIES P/N 402840 L/N ALYMO7A y el polímero POP 6 (Applied Biosystem, Foster, CA, USA).

Análisis e interpretación de los resultados de la secuenciación: Las secuencias se analizan con el programa SEQUENCING ANALYSIS 5.1.1 y de forma manual se realizan las lecturas de las secuencias.

3.2.4.6 Extracción y aislamiento de RNA y miRNAs

La extracción de RNA total a partir de tejido (conservando los miRNAs) se realizó mediante el uso de mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion, Austin, TX, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los pasos de este protocolo fueron:

- Partiendo de tejido criopreservado: Disgregación del tejido y lisis. Hasta 20 mg aproximadamente de tejido fueron sumergidos en 10 volúmenes de tampón Lisis/Binding. Inmediatamente se procedió a la disgregación del tejido utilizando un tissue-lysis (Qiagen) hasta alcanzar una completa homogenización.
- Se añadió 1/10 del aditivo de homogenado miRNA. Se mezcló por vortex. Se incubó la mezcla durante 10 minutos en hielo.
- Extracción orgánica. Se añadieron 600µl de ácido fenol cloroformo, se aplicó 30-60 segundos de vortex y posteriormente se centrifugó durante 5 minutos a 12 000 rpm a temperatura ambiente. Se recuperó el máximo volumen de la fase acuosa y se transfirió a un nuevo tubo de 1,5ml.
- Se añadió 1,25 de etanol al 100% a la fase acuosa recuperada.
- Retención del RNA. Se mezcló suavemente mediante pipeteo para homogenizar, y se transfirieron 700 µl a las columnas. Cuando se superó este volumen se repitió este paso con el volumen restante.
- Se centrifugó durante 15 segundos a 10000 rpm a temperatura ambiente.
- Lavados. Se añadió 700µl de solución de lavado 1. Se centrifugó durante 15 segundos a 10000 rpm y se descartó el eluyente. Se añadió 500 µl de solución de lavado 2. Se centrifugó durante 15 segundos a 10000 rpm y se descartó el eluyente. Se repitió nuevamente el lavado con la solución 2 y finalmente se repitió la centrifugación de 15 segundos a 10 000 rpm y se descartó el eluyente.
- Elución del RNA. Se transfirió la columna a un nuevo tubo de 1,5 y se añadió 80 µl de agua libre de RNAsa precalentada a 95 °C. Primero 40 µl se incubaron durante 1 minuto y se centrifugó a 10 000 rpm, este paso se repitió hasta completar el volumen final de 80µl y se centrifugó durante 30 segundos a 10000 rpm.

La concentración de DNA extraído según el apartado 3.2.4.2 y RNA extraído según el apartado 3.2.4.6 se midió utilizando un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 midiendo la absorbancia a 260 nm. El ratio de las lecturas a 260 y 280 (A_{260}/A_{280}) proporcionó una estimación de la pureza del DNA con respecto a los contaminantes como por ejemplo proteínas; y el ratio de las lecturas a 260 y 230 (A_{260}/A_{230}) proporcionó información sobre la presencia de otros contaminantes como sales. Las extracciones fueron consideradas de buena calidad y válidas cuando el cociente de las lecturas A_{260}/A_{280} oscilaba entre 1,8- 2, y el ratio (A_{260}/A_{230}) era aproximadamente de 2.

Cuando las muestras no tenían la pureza y la calidad adecuada antes de repetir la extracción, se procedió a aplicar el siguiente protocolo de purificación o concentración de la muestra:

- Añadir 2,5 μ l de glicogeno a 20 μ g/ μ l (Invitrogen) resuspendiendo mediante pipeteo.
- Añadir 1/10 vol de acetato de sodio 3M pH 5,2. (Sigma Aldrich, Madrid, España). Resuspender con pipeta.
- Añadir 2.5 vol de etanol absoluto frio (-20 °C) y no resuspender.
- Dejar precipitar e incubar durante 1-2 horas en -80 °C y luego incubar a -20 °C toda la noche.
- Centrifugar durante 20 minutos y 14000 rpm a una temperatura de 14 °C.
- Decantar sin perder de vista el sedimento, dejar secar a temperatura ambiente los restos de etanol, hasta que esté completamente transparente.
- Resuspender con tampón TE bajo en EDTA para DNA o agua libre de RNAsa para RNA.

El RNA de todos los casos estudiados fue conservado a -80 °C.

3.2.4.7 Estudio de la expresión de miRNAs mediante microarrays

Para el estudio de la expresión de los miRNAs se midió previamente la concentración y la pureza del RNA total, que fue determinada usando el espectrofotómetro Genequant Pro Classic (GE healthcare). La integridad fue validada mediante el uso del Bioanalizador 2100 (Agilent Technologies,

Santa Clara, CA, USA). El valor de integridad del RNA (RIN) utilizado fue ≥ 7 .

Se realizó un estudio de expresión de miRNAs de las 46 muestras de GB usando Genechip miRNA Array (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Este biochip contiene 46 228 sondas fijas que representan más de 6703 miRNAs pertenecientes a 71 organismos según la base de datos de miRNA Sanger (<http://www.mirbase.org/>), y adicionalmente 922 snoRNA y scaRNA de humano, según la base de datos EMSEMBLE y snoRNABase (Affymetrix Santa Clara, CA, USA) (Figura 17).



Figura 17. GeneChip® miRNA 1.0 Array. Affymetrix.
(www.affymetrix.com).

Se determinó la calidad e integridad del RNA total mediante electroforesis capilar. Sólo los extractos de RNA con valores de número de integridad de RNA (RIN) mayores e iguales a 6 se sometieron a un análisis adicional. El promedio de RIN usado para el análisis de biochip fue $6,83 \pm 0,18$.

Un total de 300 ng de RNA total fue marcado con el kit FlashTag Biotin HSR RNA Labeling Kit (Genisphere, Hatfield, Filadelfia). Posteriormente los biochips se hibridaron en un Affymetrix Hybridization Oven 640 (Affymetrix) a 48 °C durante 18 horas. Los biochips se marcaron con la ayuda de una Fluidics Station 450 mediante el protocolo FS450_0003 (Affymetrix) y se escanearon utilizando Genechip Scanner 3000 7G (Affymetrix). El programa Gene Chip Command Console suministrado por Affymetrix fue usado para generar el archivo CEL. Los datos de normalización y control de calidad se llevaron a cabo usando miRNA QC Tool software (www.affymetrix.com).

3.2.4.8 Estudio de la expresión de RNA: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

La qRT-PCR se llevó a cabo empleando el sistema ABI Prism 7900 HT Fast Real Time PCR (Applied Biosystem) en varias etapas.

Para realizar qRT-PCR con el objetivo de estudiar la expresión de los mRNA de los genes dianas, primeramente, se realizó una transcripción reversa (RT) mediante la cual se transformó el RNA total en cDNA utilizando High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). A continuación, con el cDNA se realizó la qRT-PCR utilizando TaqMan Gene expression Master Mix Assay (Applied Biosystems).

Se siguieron en todo momento las indicaciones del fabricante:

- Se partió de 300 ng de RNA total en 10 µl para un volumen final de reacción de 20 µl. Todos los componentes del kit se mantienen en hielo.
- Se preparó la mezcla de RT en hielo que se compone según se indica en la tabla 11 y se mezcló suavemente mediante pipeteo.
- Se añadió 10 µl de cada muestra de RNA total a la mezcla de componentes de la RT en cada tubo de PCR.
- Se le dió un spin para eliminar las burbujas y precipitar las gotas al fondo del tubo.
- Se mantuvieron los tubos en hielo hasta el momento de ponerlos en termociclador (AB Applied Biosystems 2720) siguiendo el programa, 10 minutos a 25 °C, 120 minutos a 37 °C, 5 minutos a 85 °C y finalmente a 4 °C.

Tabla 11. Componentes de la qRT-PCR

Componentes	Volumen (µl)
10X RT Buffer	2
25X dntp (100Mm)	0,8
10X RT primers	2
MultiScribe Reverse Transcriptasa	1
Inhibidor de RNAsa	1
H ₂ O libre de nucleasas	3,2
Total por reacción	10

Para realizar la qRT-PCR se siguieron estos pasos:

- Se aplicó vortex y spin suave a los componentes y se mantuvieron en hielo todos los componentes de la muestra, así como el cDNA obtenido previamente.
- Se preparó la mezcla de componentes según lo que se indica en la tabla 12.

Tabla 12. Componentes de la qRT-PCR

Componentes	Volumen (µl)
TaqMan Gene Expression Master Mix (2X)	10
Taqman Gene Expression Assay (20X)	1
cADN+H ₂ O	2 +7
Volumen total	20

- Se calculó el volumen de cada componente multiplicado por el número de muestras y pocillos a ensayar en placas de 96 pocillos (Sarstedt Nümbrecht, Alemania) y se sellaron con lámina adhesivo de sellado (Sarstedt). Finalmente se le dió un spin a la placa para eliminar burbujas y precipitar las gotas al fondo de cada pocillo.
- Se programó el sistema ABI Prism 7900 HT Fast Real Time PCR de la siguiente manera: 2 minutos de incubación a 50 °C, 10 minutos a 95 °C y 40 ciclos de PCR 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C.

Para realizar la qRT-PCR con el objetivo de estudiar la expresión de los miRNA en las muestras, se realizó una transcripción reversa (RT) mediante la cual se transformó el RNA total en cDNA TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Posteriormente, con el cDNA se realizó la qRT-PCR utilizando TaqMan Universal Master Mix II, no UNG (no contiene Uracil N-glycosylase) (Applied Biosystems).

Se siguieron en todo momento las indicaciones del fabricante:

- Se partió de 10 ng de RNA total en 5 µl para un volumen final de reacción de 20 µl. Todos los componentes del kit deben permanecer en hielo.
- Se preparó la mezcla de RT en hielo que se compone según indica la tabla 13 y se mezcló suavemente mediante pipeteo.

Tabla 13. Componentes de la RT de miRNAs

Componentes	Volumen (µl)
10X RT Buffer	1,5
25X dNTP(100Mm)	0,15
10X RT primers	2
MultiScribe RT Enzima(50U/µL)	1
Inhibidor de RNAsa (20U/µL)	0,19
H ₂ O libre de nucleasas	4,16
Total por reacción	7

- Se añadió 7 µl de la mezcla de componentes de la RT en cada tubo de PCR por cada muestra de RNA total preparada previamente en 5 µl.
- Se le dió un spin para eliminar las burbujas y precipitar las gotas al fondo del tubo.
- Se añadió 3 µl del primer 5X correspondiente a cada tubo. Se le dió un spin para eliminar las burbujas y precipitar las gotas al fondo del tubo.
- Se mantuvieron los tubos en hielo durante 5 minutos hasta el momento de ponerlos en termociclador (AB Applied Biosystems 2720) siguiendo el programa, 30 minutos a 16 °C, 30 minutos a 42 °C, 5 minutos a 85 °C y por último se bajó la temperatura a 4 °C.

En este trabajo se utilizaron sondas TaqMan que permiten medir la producción de productos de PCR mediante un sistema de sondas marcadas mediante dos fluorocromos. Su utilidad radica en que poseen un fluorocromo en su extremo 3' y una molécula en el 5' que bloquea su emisión de fluorescencia (quencher); esta sonda marcada, hibrida específicamente en la parte central del producto de PCR a obtener. De este modo, cuando se efectúa la PCR (con la sonda, más el par de cebadores específicos), la sonda híbrida en el amplicón, pero, debido a la cercanía del fluoróforo al quencher, no se emite fluorescencia; cuando la polimerasa se topa con la sonda la hidroliza mediante su actividad exonucleasa 5'-3', lo cual provoca la separación del quencher del fluorocromo y, por tanto, la emisión de fluorescencia la cual está relacionada con la cantidad de amplicón producido. Las sondas utilizadas en este estudio se especifican en la tabla 14.

Tabla 14. Sondas utilizadas para la qRT-PCR.

Sonda	Casa Comercial	Nº Catálogo
RNU66	Applied Biosystems	RT:001002
RNU48	Applied Biosystems	RT:001006
miR-200c	Applied Biosystems	RT:002300
ACTB	Applied Biosystems	HS99999903-M1
EGFR	Applied Biosystems	HS01076078-m1
ZEB1	Applied Biosystems	HS0232783-m1
CDH1	Applied Biosystems	HS01023894-m1

Hay que resaltar dos ventajas primordiales frente a las sondas inespecíficas, como el bromuro de etidio o el SYBR GREEN, ya que con las sondas taqman la fluorescencia que se produce es específica de la amplificación que estamos estudiando, además de permitir que se usen varios fluorocromos en la misma reacción y detectar varios DNA/RNA al mismo tiempo. La desventaja con la que nos encontramos es que hay que diseñar sondas específicas en cada estudio.

Normalización y análisis de la expresión por qRT-PCR

Para cuantificar de forma absoluta la expresión génica, se utiliza la cuantificación relativa del gen de estudio respecto de otro, denominado «normalizador», que se selecciona debido a su expresión casi constante. Estos genes conocidos como “house-keeping”, debido a que están involucrados en funciones básicas en la supervivencia celular, lo que suele implicar una expresión constitutiva. El gen control de referencia para los mRNA de interés fue β actina (ACTB) y para los miRNAs fueron RNU66 y RNU48. De este modo, efectuando en cada experimento la medición de los genes de interés y dividiéndolos por la expresión del gen normalizador

seleccionado es posible comparar los primeros, aún sin conocer en términos absolutos su nivel de expresión.

El parámetro Ct (mínimo umbral del ciclo) representa el ciclo en el cual la intensidad de fluorescencia y por tanto la concentración del producto amplificado está significativamente separada de la línea base de ruido o background. Todos los mRNA fueron normalizados respecto al mRNA del gen control de referencia.

El cambio del ciclo umbral (Δ Ct) de cada muestra se calculó como la diferencia entre el valor Ct del mRNA del gen de interés menos el valor de mRNA del gen control.

El $\Delta\Delta$ Ct de cada muestra se obtuvo restando el valor del Δ Ct del control a cada uno de los Δ Ct de las muestras de interés. El fold change (FC) se calculó como el $2^{-\Delta\Delta Ct}$ que también representa la cantidad relativa normalizada del gen diana.

3.2.5 Extracción de proteínas y técnica de Western blot

Para el estudio de la expresión de proteínas se extrajo la proteína total de tejido de GB mediante digestión mecánica. Para proceder a obtener proteínas de un fragmento de tejido previamente criopreservado, se han seguido los pasos siguientes:

- Se tomó un tamaño aproximado de 20 mg de tejido criopreservado. Se preparó previamente 1 ml de tampón lisis por cada 100 mg de tejido. Se pesó en una balanza de precisión el fragmento de tejido y se añadió el volumen correspondiente de tampón lisis; luego las muestras fueron mantenidas en hielo. El tampón lisis se compone de 40 μ l ortovanadato sodio, 40 μ l inhibidor proteasas y 3,8 ml tampón de lisis. El tampón lisis se preparó con Tris 76.5 mM, 0.927 gr Tris en 100 ml H₂O y a pH 6.8. A 83 ml del Tris anterior se le añade 2 g SDS y 10 ml Glicerol.

- Se utilizó un homogenizador rotor IKA para triturar el tejido, posteriormente se mantuvo 10 minutos en hielo. Se utilizó un sonicador y se aplicó 3 pulsos a máxima potencia.

- Se centrifugó a 4 °C, durante 30 minutos a 1500G. Se recogió el sobrenadante donde está la proteína y se procedió a hacer alícuotas de 50 μ l

guardándose a -20 °C para uso inmediato o a -80 °C para una conservación a largo plazo.

Cuantificación de proteínas

Cuantificamos la cantidad de proteína mediante el método de Lowry. Las lecturas de la absorbancia a 660 nm fueron leídas en el lector de placas Victor X3 Pekin Elmer 2030. Sobre placas de 96 pocillos de fondo plano se cargó por pocillo: 98 µl H₂O + 2 µl muestra (proteínas) + 100 µl reactivo de Lowry. Se incubaron 20 minutos en oscuridad. A continuación se añadieron 50 µl del reactivo de Folin y se incubaron 30 minutos en oscuridad. A la vez se realizaron las lecturas para la recta patrón con suero FBS. Las muestras se cargaron por triplicado y se leyeron en el lector de placas.

El método de Lowry es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas solubles. Una vez obtenidas las lecturas se realizaron los cálculos analizando los valores en una gráfica y se trazó la línea de tendencia y se calculó el coeficiente R^2 la cual debe ser $R^2 \geq 0,95$. Cuando esto se cumple utilizamos la fórmula de la ecuación de la recta obtenida para el cálculo de la cantidad de proteína que se expresa en µg/µl.

Técnica de Western blot

Los pasos para aplicar esta técnica fueron los siguientes:

- Se cargaron 30-50 µg de proteínas en un gel Mini protean TGX 12% (Biorad) para su separación mediante electroforesis. Para la electroforesis se utilizó *Running Buffer* (Tris 0,25M, Glicina 2M, SDS 1%). Como marcador de peso molecular se utilizó *el Precision protein Plus Standard* (Biorad, Madrid, España). Una vez separas las proteínas, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa Turbo Midi (Biorad, Madrid, España) y se utilizó el sistema *Trans Blot Turbo TM Transfer System* (Biorad).
- Seguidamente se bloquearon las uniones inespecíficas mediante incubación de la membrana con tampón de bloqueo (Tampón salino Tris y Tween (TBST), 5% leche desnatada Central Lechera Asturiana en polvo) durante 1 hora, con excepción de los estudios de proteínas fosforiladas que para ello se incuban en TBST, y 5% de albumina de suero bobino (BSA).

- Durante toda la noche se incubaron las membranas con los anticuerpos primarios EGFR, E Cadherina (CDH1) y ZEB1 en las diluciones de trabajo que se informan en la tabla 15. Se utilizó como control de carga la detección de la actina con un anticuerpo específico conjugado con peroxidasa (Sigma Aldrich).
- Se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con tampón TBST y se incubaron con el anticuerpo secundario (ratón/conejo) correspondiente durante 1 hora.
- Posteriormente se repitieron los lavados y la membrana se reveló utilizando quimiluminiscencia y el kit Supersignal West Pico (Fisher Cientific, Madrid, España) en la cámara de revelado automática Image Quant LAS 4000.

Tabla 15. Anticuerpos utilizados en el western blot.

Anticuerpo	Casa		Especie	Dilución
	comercial	Peso molecular		
ZEB1	Cell Signaling	200 kDa	ratón	1/750
EGFR	Sigma	175 kDa	conejo	1/1000
CDH1	Sigma	135 kDa	conejo	1/1000
β -Actina	Sigma	42 kDa	ratón	1/25000

Cuantificación de las bandas de proteínas: Una vez obtenidas las imágenes, se utiliza el programa Image J para cuantificar las bandas obtenidas. Luego se normalizaron los resultados utilizando las bandas de actina que previamente se revelaron como control.

3.2.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los diferentes parámetros analizados se dividió según el tipo de variable, en cuantitativa, dicotómica y cualitativa. Para las variables cuantitativas (edad, IK, DSI, tamaño, supervivencia y Ki67) se realizó el test de Kruskal Wallis, utilizándose el programa R version 3.3.1 (New Jersey, USA).

Entre las variables dicotómicas (sexo, presencia de trisomías y polisomias del cromosoma 7), se utilizó el test Chi-cuadrado.

Entre las variables cualitativas (localización, síntoma inicial, tratamiento, patrones de infiltración) no fueron aplicables los métodos estadísticos por ser cohortes pequeñas, tan solo se pudo aplicar las tablas de contingencia y las tablas de frecuencias relativas.

La correlación entre el estado de amplificación o no amplificación del gen *EGFR*, y la expresión inmunohistoquímica de la proteína EGFR se realizó según el test de Chi-cuadrado. Pero debido a los valores pequeños y al tamaño muestral se realizó el coeficiente de asociación gamma de Goodman and Kruskal. Se trata de una medida que varía entre -1 y 1, valores negativos para asociaciones decrecientes y valores positivos para asociaciones crecientes; cuanto más cerca de 1 en valor absoluto, mayor es el grado de asociación.

El estudio de la supervivencia respecto a los diferentes parámetros clínicos, histopatológicos y genéticos, se realizó con el análisis estadístico de Kaplan- Meier, considerándose significativo un p-valor = 0,05 para el test log-rank. Las variables clínicas analizadas respecto a la supervivencia fueron: tamaño del tumor, Índice de Karnofsky (IK) y los distintos tratamientos utilizados en los pacientes (quimioterapia, radioterapia, quimioterapia y radioterapia).

Los parámetros genéticos se analizaron los p-valores proporcionados por el test Chi-cuadrado de homogeneidad de proporciones de los genes estadísticamente significativos al nivel de significación habitual ($p = 0.05$).

Los archivos (CEL files) del biochip de miRNAs se analizaron mediante el software Partek Genomic Suite 6.6 (Partek Inc. St. Louis, MO, USA). Los archivos fueron previamente normalizados con el robusto algoritmo multi-chip-average (RMA). Los miRNAs estadísticamente significativos se filtraron mediante p valores $\leq 0,05$, mediante el test de Kruskal Wallis.

Se realizó un análisis multivariante discriminante " Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales " (PLS-DA) utilizando la biblioteca de análisis multivariante estadístico de PLS Toolbox 6.7.1 (Eigenvector Research, Inc. USA) en el Matlab R2008a (MathWorks, Inc., EE.UU).

El análisis funcional de los miRNAs significativos se realizó mediante el software Pathway Studio versión 9.0 (Elsevier, España). Este programa nos

facilitó el estudio de los procesos biológicos más relevantes implicados en nuestros miRNAs significativos.

3.3 Generación de cultivos celulares para el estudio del comportamiento del miR-200c

En este apartado se procedió primeramente, a la obtención y caracterización de cultivos celulares a partir de tumores primitivos de nuestros casos de GB, para su posterior mantenimiento en cultivo, lo que permitió la generación de modelos celulares de transfección y migración celular. También se utilizaron dos líneas celulares de glioblastoma comercializadas, la U87 y la U118 (ATCC, LGC Standards S.L.U, Barcelona, España).

Previamente se realizaron los estudios morfológicos y genéticos, para la caracterización de los cultivos, así como los ensayos de viabilidad celular necesarios para iniciar el modelo celular.

3.3.1. Obtención y caracterización de los cultivos celulares

Para la obtención de los cultivos celulares se recogió un fragmento del tumor de 1 cm³, en máximas condiciones de esterilidad, y se depositó en un tubo con medio de cultivo RPMI 1640 y los antibióticos penicilina, estreptomycin (1%) y gentamicina (0,2%).

Para la obtención de células se utilizó la disgregación enzimática con el siguiente protocolo:

- Se troceó el fragmento con bisturí estéril sobre una placa Petri. Los múltiples fragmentos pequeños se introdujeron en un tubo con colagenasa tipo II al 0,2 %.
- Se matuvo en el baño a 37 °C durante unos 20 minutos para que la colagenasa actúe óptimamente. Transcurrido ese tiempo se dejaron sedimentar los fragmentos, se trasvaso el sobrenadante a otro tubo y se centrifugaron ambos durante 5 minutos a 1000 rpm.
- Se realizaron varios lavados con medio de cultivo. El número de lavados depende de la cantidad de material que se obtiene.
- Se resuspendió el sedimento celular con medio de cultivo RPMI-1640 y una estabilidad a pH 7-7.2. El medio fue suplementado con 10% de

FBS, 1% L-glutamina, y una mezcla de penicilina (50 U/ml), y estreptomycin (50 µg/ml). (Gibco BRL).

- Se sembró en frascos de cultivo Falcon de 25 cm², (Nunc, Roskilde, Denmark) y en condiciones controladas manteniendo la humedad, a 5% CO₂ y a 37 °C de temperatura.
- Se observó diariamente el crecimiento con microscopio de contraste de fases (Leica DMIL LED –DFC320).

Las células pueden crecer en suspensión pero lo más habitual es que lo hagan pegadas a la superficie del frasco, creciendo en una monocapa. Se les cambia el medio cada dos días.

Cuando el crecimiento fue adecuado y las células alcanzaron la confluencia se procedió al doblaje, consistente en distribuir las células crecidas en varios frascos.

- Se utilizó tripsina-EDTA (Gibco BRL) estéril para levantar las células de la superficie del frasco.
- Se retiró el medio de cultivo, se lavaron las células con PBS estéril, y se añadió 1 ml de tripsina al frasco dejando actuar entre 2-5 minutos a 37°C en estufa dependiendo de cada tipo celular, para despegar las células de la superficie del frasco.
- Se añadió medio de cultivo que contiene suero bovino fetal para detener el efecto de la tripsina sobre las células y se pasó todo el material a un tubo de centrifugación.
- Se centrifugó 5 minutos a 1200 rpm.
- Se eliminó el sobrenadante conservando el pellet de células.
- Se añadió medio de cultivo nuevo, se dividió y se sembraron las células en frascos nuevos.

3.3.1.1 Estudio inmunocitoquímico

Estos estudios se realizaron sobre portaobjetos de vidrio con cámara Nunc™ Lab-Tek™, con células en cultivo celulares siguiendo el protocolo:

- Retirar el medio de cultivo celular y lavar 3 veces con PBS.

- Fijar las células con una solución de metanol-acetona en una proporción 1:1 durante 10 minutos.
- Inhibir de la peroxidasa endógena con Peroxidase blocking solution (Dako).
- Lavar 3 veces con PBS.

- Incubar 30 - 60 minutos con el anticuerpo primario correspondiente en cada pocillo.
- Lavar 3 veces con PBS.
- Incubar 30 minutos con el sistema de detección ENVISION (Dako).
- Lavar 3 veces con PBS.
- Lavar 3 veces con agua destilada.
- Revelar 2 minutos con el sistema ENVISION (sustrato +cromógeno)
- Lavar con agua corriente.
- Desmontar los pocillos para liberar el portaobjeto.
- Contrastar con hematoxilina 2 minutos
- Deshidratar con alcoholes graduales (70, 80, 90 grados) y xiloles.
- Montar el cubreobjeto con entellan.

Los anticuerpos utilizados en el estudio han sido: GFAP, Ki-67, p53, y EGFR. Las características de los anticuerpos se indican en la tabla 16.

Tabla 16. Anticuerpos utilizados en el estudio inmunocitoquímico

Anticuerpo	Dilución	Casa	Monoclonal/policlonal
GFAP	1/500	Dako	policlonal
Ki-67/MIB-1	1/200	Dako	monoclonal
EGFR	1/50	Dako	monoclonal
p53	Pre-diluido	Dako	policlonal

Para la lectura de la expresión de GFAP, Ki-67, p53, EGFR, se siguió la valoración descrita anteriormente en el apartado 3.2.3.

3.3.1.2 Estudio citogenético

Para estudiar el complemento cromosómico de las células en cultivo se procedió a realizar técnicas de citogenética convencional (cariotipo), y técnicas de citogenética molecular por hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH).

Sacrificio celular. Realización de extensiones

Cuando el cultivo ha alcanzado un índice mitótico adecuado, se procedió al sacrificio celular para la obtención de metafases.

Este proceso se realizó según el siguiente protocolo:

- Se añadió 0,1 ml de Colcemid (Gibco BRL) al frasco y se dejó en la estufa (37 °C) durante 2 horas mínimo.
- Se recogió el medio del frasco y se guardó en un tubo.
- Al frasco se le añadieron 2 ml de tripsina y se dejó 5 minutos en el baño (37 °C).
- Para recoger las células se utilizó su medio, vertiéndolo en el frasco, resuspendiendo varias veces para recoger todas las células. De esta manera se sueltan las células del frasco.
- Se pasaron a un tubo y se centrifugaron 5 minutos a 1200 rpm.
- Se eliminó el medio y se añadió 5 ml de cloruro de potasio (KCL) (0.075M) y se incubó en el baño (37 °C) durante 15 minutos.
- Se centrifugó 5 minutos a 1200 rpm.
- Se eliminó el sobrenadante y se le añadió 5 ml de carnoy compuesto por una mezcla de metanol y ácido acético, a razón 3:1.
- Se incubó en nevera a 4 °C, 20 minutos.
- Se centrifugó a 1200 rpm, 5 minutos.
- Se retiró el sobrenadante y se volvió a añadir carnoy recién preparado. Este lavado se repitió un número de veces que depende de la cantidad de muestra que haya quedado en el tubo.
- Se guardaron los tubos a -20 °C hasta el momento de hacer extensiones.

Las extensiones servirán para estudiar las metafases y para realizar FISH de cultivos celulares. Para realizar extensiones se retira casi todo el carnoy y se resuspende el sedimento celular. Se deja caer una gota con una pipeta Pasteur sobre un portaobjetos limpio y frío.

Cariotipo: Para el estudio del cariotipo se llevó a cabo un protocolo de tinción de bandas G. Las preparaciones deben de estar envejecidas a temperatura ambiente durante 5-6 días. La preparación envejecida se introduce en tripsina 0,25% en PBS (Gibco BRL) durante aproximadamente 2-3 segundos. Se lava con agua corriente. Se observa el estado de las metafases en el microscopio de contraste de fases. Las preparaciones se tiñen con una solución de Giemsa (10%) en tampón McIlvaine (pH=6,8) durante 5 minutos. Se lavan con agua corriente y se dejan secar.

El análisis se realiza con un microscopio Leica DMD 108 con el objetivo de 40x que permitió localizar las mitosis y con el objetivo de 63x, se tomaron fotografías de las mitosis encontradas por campo anotando las coordenadas de cada mitosis. Las fotos se analizaron utilizando el programa Adobe Photoshop CS5 para obtener los diferentes cromosomas individuales para ordenarlos posteriormente en una plantilla creada para tal fin y poder detectar las anomalías o alteraciones cromosómicas de cada caso.

FISH: El análisis de FISH se realizó sobre núcleos y metafases provenientes de cultivos celulares. El protocolo que se ha seguido es el mismo que se ha detallado en el punto 3.2.4.1 eliminando los dos primeros pasos relacionados con la rehidratación y desparafinización de las muestras.

La valoración de los resultados de FISH se ha realizado en las siguientes condiciones: Las señales fluorescentes se evaluaron utilizando un fotomicroscopio Leica DFC 340FX con filtros adecuados. En los estudios se evaluaron entre 100-150 núcleos de las células cultivadas y en todas las metafases. Se valoraron las señales rojas que marcan el gen *EGFR* y la señal verde de los centrómeros del cromosoma 7. Se calculó el número de señales para el gen *EGFR* y el CEP 7 en cada caso, seguido del cálculo de la ratio *EGFR/CEP 7*. El gen *EGFR* se consideró amplificado cuando la relación *EGFR/CEP 7* fue mayor de 2¹⁷⁰.

3.3.1.3 Extracción de DNA de los cultivos celulares

Se realizó la extracción de DNA a partir de 4×10^6 células de los diferentes cultivos celulares y se utilizó el kit QIAamp DNA Blood mini (Invitrogen).

Para la extracción de DNA de células se siguió el protocolo recomendado por el fabricante que puede resumirse en los siguientes pasos:

- Obtención del pellet de células. Hasta 4×10^6 células fueron tripsinizadas y luego resuspendidas en 200 μ l de PBS (Gibco BRL).

- Digestión. Se añadieron 20 μ l de proteinasa K, agitación por vortex 15 segundos e incubación a 56°C durante 10 minutos.

- Se añadió 200 μ l de etanol 100%, agitación por vortex 15 segundos.

- Retención del DNA. Se realizó la transferencia de la mezcla anterior a una columna de sílica-gel (QIAamp spin column), se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto y se eliminó el eluyente. Se añadió 500 μ l del tampón AW1 y se centrifugó a máxima velocidad (14 000 rpm) durante 1 minuto desechándose el eluyente. Se añadió 500 μ l del tampón AW2 y se centrifugó a máxima velocidad (14000 rpm) durante 3 minutos desechándose el eluyente. Se repitió la centrifugación de 1 minuto para eluir cualquier resto de solución de lavado.

- Elución del DNA. Se añadieron 80 μ l de tampón TE bajo EDTA, primero 40 μ l incubándose durante 2 minutos y centrifugándose a 10 000 rpm durante 1 minuto, este paso se repitió hasta completar el volumen final de 80 μ l.

El DNA de todos los casos estudiados fue conservado a -20°C .

3.3.1.4 Caracterización genética de los cultivos celulares por MLPA

Para este estudio se utilizó DNA extraído de los diferentes cultivos celulares para el estudio por MLPA siguiendo el protocolo descrito en el punto 3.2.4.4 y utilizando el kit Salsa MLPA KIT P105-D1 Gliomas-2, para estudiar el estatus de *EGFR*.

3.3.2 Transfección en células tumorales de los cultivos celulares de glioblastomas: Inhibición de miR-200c, sobreexpresión de miR-200c y silenciamiento de EGFR

Para la transfección en las líneas celulares y cultivos primarios de GB. Se utilizaron inhibidores y precursores (activadores) de miRNAs y un silenciador de EGFR (Tabla 17). Los estudios de transfección se llevaron a cabo mediante el método de lipofección con Lipofectamina RNAimax (Invitrogen).

La lipofección es una estrategia para transportar e introducir material genético en células. Este material genético no puede introducirse directamente, sino que debe ser transportado en un sistema que lo protege.

En la lipofección, el material genético va introducido en un liposoma catiónico que tiene afinidad por la membrana. Este es un sistema que transporta el inhibidor o activador del miRNA o el silenciador de EGFR hacia el interior de la célula. Se caracteriza por su baja toxicidad, alta versatilidad química y alta eficacia. Se utilizan controles positivos y negativos que aparecen referidos en la tabla 17 para garantizar la eficiencia de la transfección en las células.

Tabla 17. miRNA utilizados en la transfección.

miRNA	Concentración final
mirVana TM miRNA mimic miR-1 Positive Control	15 nM
mirVana TM miRNA mimic Negative Control #1	15nM
mirVana TM miRNA inhibitor Negative Control #1	70nM
mirVana TM miRNA inhibitor let-7c Positive Control	70nM
Hsa-mir-200c-3p ID: MH11714 mirVana TM miRNA inhibitor	70 nM
Hsa-mir-200c-3p ID: MC11714 mirVana TM miRNA mimic	15nM
Ambion, Silencer Select RNA - EGFR s-563	30 nM

Para realizar el método de transfección con Lipofectamina RNAiMAX se realizó el protocolo recomendado por el fabricante, que puede resumirse en los siguientes pasos:



- Se despegan las células sembradas en frasco utilizando tripsina estéril y se realiza un conteo de células utilizando Counting Slides dual y el Núcleo counter TC20 (Biorad, Madrid, España), para determinar el número de células totales, y la cantidad de células vivas usando colorante azul tripan.
- Se siembran 200000 células por pocillo en placas multipocillos (6 well plate NUNC) 24 horas antes de la transfección y con una confluencia del 60-80%.
- Se le cambia el medio a las células y se le pone medio sin antibiótico y sin FBS.
- Se realizan dos mezclas, la mezcla 1 de cada RNA con medio OPTIMEM (Gibco BRL), y la mezcla 2 de lipofectamina RNAiMax con OPTIMEM. OPTIMEM es un medio adecuado para favorecer la formación del complejo de lipofección.
- Se une la mezcla 1 con la mezcla 2 y se deja incubar 5-20 minutos a temperatura ambiente.
- Se añaden 250 µl de la mezcla en cada pocillo.
- Se incuba la placa a 37 °C en estufa 6 - 24 horas.
- Se cambia el medio de cultivo.

A las 24 horas postransfección se levantan las células, se realiza conteo celular y se siembran 10000 células por pocillo en placas de 96 pocillos para ensayos de proliferación celular. También se siembran 30000 células por pocillo en portaobjetos de vidrio con cámara Nunc™ Lab-Tek™ (Nunc, Rochester, New York, USA) para inmucitoquímica y 300000 células para estudios de migración celular.

A las 48 horas postransfección se recogen las células de los pocillos para la extracción de ácidos nucleicos (RNA) para el análisis de la eficiencia de la inhibición del miR-200c, sobreexpresión miR-200c o silenciamiento de

EGFR mediante qRT-PCR. A las 72 horas se recogen las células para la extracción de proteínas para el análisis de dianas por western blot.

La eficiencia de la transfección se confirmó midiendo la expresión por qRT-PCR de dianas de controles internos de transfección, y también utilizando el control fluorescente Alexa Fluor Red fluorescente BLOQUE-iT (Life Technologies) incorporado a las células controles mediante transfección con lipofectamina RNAiMAX. Se visualiza con un microscopio Leica DMIL LED y para la captación de imágenes una cámara Leica DFC 42°C.

3.3.3 Estudios de viabilidad celular

Los estudios de viabilidad celular comprenden tanto el ensayo de viabilidad celular por luminiscencia, como el control de la viabilidad de las células en cultivo para comprobar que estén libres de contaminación por micoplasmas. Los ensayos de viabilidad celular por luminiscencia se realizan posteriormente, después del ensayo de transfección tanto en las células controles como en las trasfectadas. Por su parte la detección de micoplasmas se realizó antes de iniciar el modelo de transfección y posterior a este.

Ensayo de Viabilidad celular por luminiscencia

Para el ensayo de viabilidad celular se utilizó el kit comercial Cell Titer-Glo Luminescent Assay (Promega Biotech Ibérica, Madrid, España), basado en la cuantificación del ATP presente en el medio tras añadir el reactivo CellTiter-Glo (Figura 18). La generación de una señal luminiscente se cuantificó mediante el sistema de luminometría (Victor X3, Perkin Elmer). Previamente se hizo un estudio para determinar el número óptimo de células por pocillo según cada tipo celular variando la cantidad de células 0-50000 células por pocillo. Se llegó a la decisión de sembrar 10000 células.

Se realizó siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante que se describe brevemente a continuación:

- En una placa de 96 pocillos se siembran inicialmente con 10000 células por pocillo en un volumen de medio de cultivo de 200 μ l.

- El ensayo se hace por triplicado y se preparan pocillos controles sin células para obtener el valor de fondo y restarlo a la medida obtenida.
- Se equilibra la placa a temperatura ambiente 30 minutos.
- Se añade por pocillo 100 µl del reactivo CellTiter - Glo que se prepara añadiendo el CellTiter tampón al CellTiter sustrato.
- Se coloca la placa en el luminómetro y se programa para que realice un movimiento orbital de 2 minutos, luego una incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos para estabilizar la señal de luminiscencia y luego tomar las medidas.

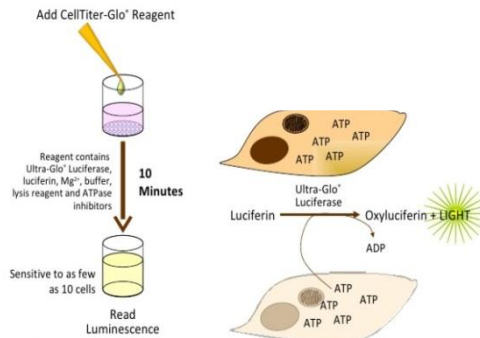


Figura 18. Esquema del ensayo de viabilidad celular (www.slideshare.net).

Detección de Micoplasmas

Para la detección de micoplasmas en cultivos celulares se realizó una PCR y se utilizó el kit Mycoplasma Test Kit EZ-PCR (Lonza, Rockland, ME, USA). Los pasos a seguir fueron:

- Se recogió 1 ml de sobrenadante de las células en cultivo que haya estado en contacto con las células al menos 3 días.
- Se centrifugó el sobrenadante a 20000g durante 10 minutos. Se obtendrá el sedimento en el cual podría estar el micoplasma si estuviera presente en el cultivo celular.
- Se añadió 10 µl del tampón presente en el kit y se homogeneizó. Se incubó a 95°C durante 3 minutos.
- Se realizó una PCR utilizando los componentes que se describen en la tabla 18, poniendo un control negativo y un control positivo (Positive Template control) este último a una dilución 1/500.

Tabla 18. Componentes de la PCR.

Componentes	Volumen (µl)
H ₂ O	6
Reaction Mix PCR	2
Muestra	2
Volumen Total	10

- Programa del termociclador:

94 °C	30 seg	
96 °C	10 seg	} 35 ciclos
55 °C	5 seg	
60 °C	4 min	
94 °C	30 seg	
60 °C	120seg	
72 °C	5 min	

- Electroforesis. Los productos de PCR obtenidos se corrieron en un gel de agarosa al 2%. Para preparar el gel de agarosa se cargaron las muestras en el gel y se corrieron las muestras a 120V durante 30 minutos aproximadamente. Se reveló el gel de agarosa poniéndolo en la cámara del transiluminador de luz UV.

Análisis de los productos amplificados: Para dar como positivo la presencia de micoplasmas en el cultivo celular debe aparecer en la imagen las bandas limpias aproximadamente a 270 bp y a la misma altura que el control positivo de micoplasma.

3.3.4 Extracción y aislamiento de RNA y miRNA de los cultivos transfectados

Para la extracción y aislamiento de RNA y miRNA a partir de células en cultivo se siguieron los pasos que marca el protocolo mirVana miRNA

Isolation Kit (Ambion), siguiendo las instrucciones del fabricante descritas para cultivos celulares.

Inicialmente las células adherentes fueron tripsinizadas y resuspendidas en 1ml de PBS y mantenidas en hielo. Luego se centrifugó a baja velocidad 800 rpm y fue eliminado el PBS. Los pasos siguientes son los que están referidos en el punto 3.2.4.6.

3.3.5 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real

Para el caso del RNA total extraído de células previamente transfectadas con algún RNA varía el protocolo, según los pasos siguientes:

- Por cada muestra de RNA total (10 ng) preparada previamente en 5 μ l, se añadió 3 μ l del primer TaqMan MicroRNA Assay 5X correspondiente a cada tubo. Se le dió un spin para eliminar las burbujas y precipitar las gotas al fondo del tubo.
- Se incubó el tubo de PCR 5 minutos a 85 °C y posteriormente 5 minutos a 60°C.
- Se colocaron los tubos en hielo y se añadieron 7 μ l de la mezcla de componentes de la RT. Se le dió un spin para eliminar las burbujas y precipitar las gotas al fondo del tubo.
- El programa del termociclador fue el mismo que el del punto 3.2.4.8.
- Se aplicó vortex y spin suave a los componentes y se mantuvieron en hielo todos los componentes de la muestra y el cDNA obtenido previamente.
- Se preparó la mezcla de componentes según indica la tabla 19.

Tabla 19. Componentes de la qRT-PCR de miRNAs

Componentes	Volumen (μl)
TaqMan Universal Master Mix II, no UNG (2x)	10
Taqman MicroARN Assay (20X)	1
cDNA+H ₂ O	2 +7
Volumen total	20

- Se calculó el volumen de cada componente multiplicado por el número de muestras y pocillos a ensayar en placas de 96 pocillos (Sarstedt)

y se sellaron con film adhesivo (Sarstedt). Finalmente se le dió un spin a la placa para eliminar burbujas y precipitar las gotas al fondo de cada pocillo.

- Se programó el sistema ABI Prism 7900 HT Fast Real Time PCR de la siguiente manera: 2 minutos de incubación a 50°, 10 minutos a 95°C y 40 ciclos de PCR, 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C.

Las sondas utilizadas para la qRT-PCR están detalladas en la tabla 14 en el apartado de “Estudios genéticos y epigenéticos”.

3.3.6 Extracción de proteínas de cultivos celulares y técnica de western blot

Para proceder a obtener proteínas de células en cultivo, se siguieron los pasos descritos a continuación:

- Lavar las células 3 veces con PBS 1X estéril y congelar a -80°C al menos durante 2 horas.
- Preparar el tampón lisis descrito anteriormente, según las placas que vayamos a procesar.
- Añadir 500 µl por frasco de 75 cm², o ajustar el volumen si se utilizan placas de 6 pocillos. Raspar la superficie con scrapper para levantar las células y recoger todo en un eppendorf.
- Incubar durante 30 minutos en hielo los eppendorf.
- Centrifugar a 4 °C, durante 30 minutos a 1500g.
- Trasladar el sobrenadante a un nuevo eppendorf y desechar el pellet.

La proteína obtenida se cuantifica y se utiliza para estudios por western blot según el procedimiento explicado en el apartado 3.2.5.

3.3.7 Estudios de migración celular

El estudio de migración se realizó utilizando “CytoSelect TM Wound Healing Assay Kit (Bionova, Madrid, España). Está basado en el análisis de un cultivo en monocapa de células confluentes hacia una “brecha” o “herida” por inserción de una estructura plástica o membrana de forma lineal que impiden el crecimiento. La eliminación del inserto y estudio secuencial del crecimiento define la capacidad migratoria de las células.

Se sembraron 500000 células por pocillo en placas de 24 pocillos que previamente tenían el inserto lineal que impedía el crecimiento en esa zona de la placa. Pasadas 24 horas se levantó el inserto y se hicieron fotos a las 0h, 3h, 6h, 12 h, 20h y 24 h (Figura 19).

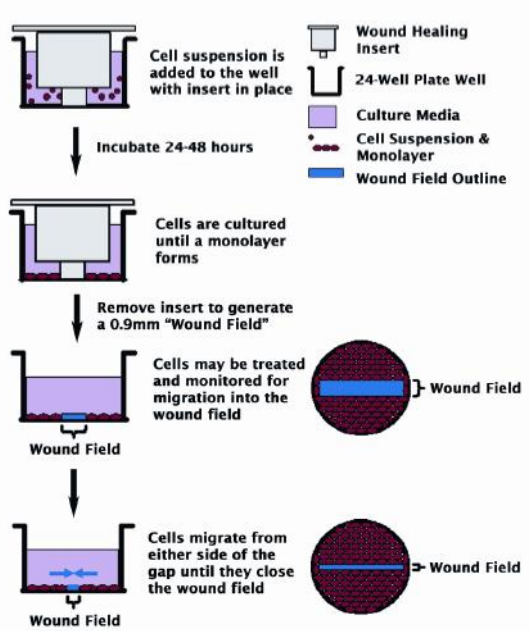


Figura 19. Esquema representativo del ensayo de migración celular. (*CytoSelect™ Wound Healing Assay Protocol*).

El análisis se realizó sobre las imágenes obtenidas secuencialmente, con un microscopio Leica DMIL LED y captación de imágenes con la cámara Leica DFC320 mediante un estudio subjetivo, manual y una objetivación morfométrica automatizada, de la ocupación del espacio por la migración de las células.

Con ayuda del programa de morfometría Image Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Rockville, USA) se analizaron las imágenes para estudiar la migración celular.

4. RESULTADOS

4.1 Estudio clínico

El estudio clínico del presente trabajo está basado en el análisis de 46 tumores con el diagnóstico de glioblastoma primario, IDH no mutado, de pacientes intervenidos en el Servicio de Neurocirugía del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Este estudio ha sido revisado y aprobado por el Comité Ético del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

Los resultados del estudio clínico aparecen referidos en la tabla 20, en ella se describe la edad, sexo, localización, tamaño del tumor, síntoma inicial, duración del síntoma inicial (DSI), índice de Karnofsky, cirugía, radioterapia, quimioterapia y la supervivencia de los 46 pacientes analizados.

Sexo y Edad: En los pacientes estudiados se ha observado una prevalencia mayor en hombres que en mujeres, el 63% (29 casos) fueron hombres y el 37% (17 casos) mujeres, con un ratio 1,7/1. La edad al momento del diagnóstico osciló en un rango de 24 a 75 años, siendo la media de edad de los hombres de 58 años y la de las mujeres de 60 años.

Síntomas: Se observó como síntoma inicial déficit neurológico (DN) y/o hipertensión intracraneal (HTIC), con excepción de un caso que presentó crisis comicial (CC).

DSI: La duración del síntoma inicial en los casos con DN fue de 1-37 días con una media de 11,4 días, con HTIC fue de 1-45 días con una media de 14,3 días y el caso que presentó CC de 4 días.

IK: El índice de Karnofsky se situó en 100 en cuatro pacientes (9%); en 90 en nueve pacientes (20%); en 80 en siete pacientes (15%); en 70 en 24 pacientes (52%), y por debajo de 60 en dos pacientes (4%).

Tamaño del tumor: La valoración del tamaño del tumor se realizó sobre la imagen radiológica tomándose como valor el diámetro mayor del tumor. Fue menor de 4 cm en 22 casos (48%), de 4 a 6 cm en 20 casos (43%) y mayor de 6 cm en 4 casos (13%).

Localización: La localización del tumor en los casos estudiados fue variable, en el lóbulo temporal 19 tumores (42%), en el lóbulo parietal 13 (28%), en el lóbulo frontal 11 (24%), dos tumores se localizaron en el lóbulo occipital (4%) y uno en el cuerpo calloso (2%). Cabe destacar que la

mayoría de los casos se localizaron en la región temporo-parietal, un total de 32 tumores.

Tabla 20. Estudio clínico de los 46 casos de glioblastoma

Casos	Edad	Sexo	Síntoma inicial	IK	DSI (días)	Localización tumoral	Tamaño (cm)	Tratamiento adyuvante	Supervivencia (meses)
1	56	F	HTIC	70	13	T Iz	2	RT+QT-T	23
2	72	F	HTIC	70	14	F Dr	6	RT+QT-T	8
3	63	F	HTIC	40	45	T Iz	7	RT+QT-T	11
4	69	M	HTIC	70	30	T Dr	6	RT	7
5	48	M	DN	70	21	T Iz	5,3	RT+QT-T	11
6	55	F	HTIC	70	2	Cc	4	QT-T	4
7	59	F	DN	90	14	P Iz	2,6	RT	18
8	58	F	HTIC	70	21	T Iz	6	RT+QT-T	23
9	61	M	HTIC	70	45	T Dr	8	RT+QT-T	12
10	59	F	DN	60	1	P Iz	2	RT+QT-T	20
11	66	M	DN	90	15	P Iz	4	RT+QT-T	6
12	55	M	CC	70	4	T Dr	3	RT+QT-T	5
13	66	F	HTIC	70	-	F Iz	4	RT	36
14	69	M	HTIC	70	7	T Dr	6	RT+QT-T	12
15	66	M	DN	70	1	F Iz	2	RT	5
16	61	F	HTIC	70	5	F Dr	6	RT	2
17	58	F	HTIC	70	5	O Iz	2	RT+QT-T	20
18	57	M	HTIC	80	5	F Dr	3,5	RT	17
19	71	M	DN	70	6	F Dr	2	RT+QT-T	3
20	63	M	HTIC	70	1	T Iz	2	RT	5
21	45	M	DN	80	31	T Iz	7	RT	-
22	24	M	HTIC	90	7	T Iz	4	RT	2
23	67	M	DN	100	7	T Dr	5	RT+QT-T	7
24	73	M	DN	70	7	P Dr	2,5	RT	5
25	45	M	DN	70	21	P Dr	2,5	RT+QT-T	10
26	42	M	HTIC	90	1	P Dr	2	RT	-
27	60	M	HTIC	70	18	P Iz	3,7	RT	5
28	31	F	DN	70	1	F Dr	2	RT	-
29	73	F	DN	70	1	P Dr	6	RT+QT-T	26
30	35	M	DN	80	37	T Iz	2	RT	38
31	74	F	HTIC	70	7	F Iz	4	Paliativo	1
32	66	M	DN	100	30	T Iz	4	RT+QT-T	11
33	35	F	HTIC	100	1	P	1	RT	-
34	54	M	HTIC	100	7	T Iz	4	RT+QT-T	5
35	63	M	HTIC	80	14	F Dr	4	RT+QT-T	36
36	75	M	DN	70	1	P	3,5	Paliativo	6
37	55	M	DN	80	9	F Dr	2	RT+QT-T	26
38	73	M	HTIC	70	30	O Iz	6,6	RT+QT-T	11
39	63	F	DN	80	1	P O	4	QT (BCNU)	9
40	67	M	DN	90	1	P Dr	3	RT+QT-T	21
41	75	F	DN	70	15	F Iz	1	Paliativo	2
42	60	M	HTIC	90	7	F Iz	6	QT(BCNU)	2
43	50	M	DN	80	35	T Dr	3,5	RT	10
44	65	F	DN	90	1	T Dr	1	RT+QT-T	22
45	38	M	DN	90	8	P Dr	1	RT	30
46	52	M	DN	90	14	T Iz	2	RT	23

CC: Crisis comicial; **Cc** Cuerpo calloso; **DN:** Déficit neurológico; **Dr:** Derecha; **DSI** duración del síntoma inicial; **F:** Femenino; **F:**Frontal; **HTIC:** Hipertensión intracraneal; **Iz:** Izquierda; **M:** Masculino; **O:** Occipital; **P:**Parietal; **QT-T:** Quimioterapia –Temozolomida; **QT (BCNU):** Quimioterapia (carmustina (BCNU)), **RT:** Radioterapia; **T:** Temporal.

Tratamiento: Todos los pacientes fueron intervenidos quirúrgicamente realizando una resección del tumor, y como tratamiento adyuvante se utilizó radioterapia o quimioterapia o la combinación de los dos tratamientos.

En el tratamiento radioterápico la dosis empleada fue de 46- 60 Gy. El tratamiento quimioterapéutico se basó en la utilización de temozolomida (QT-T) y/o BCNU.

El 48% de los pacientes recibió un tratamiento mixto de radioterapia y quimioterapia. En el resto de los casos el tratamiento aplicado fue: 18 casos (39%) se trataron con radioterapia, dos casos (4%) recibieron como tratamiento quimioterapéutico implantes que contienen el agente alquilante carmustina (BCNU), un caso (2%) con quimioterapia-temozolomida, 3 casos (7%) recibieron un tratamiento paliativo de los síntomas post-cirugía.

Supervivencia: La supervivencia de los pacientes desde el diagnóstico hasta el su fallecimiento osciló entre 1- 38 meses con una media de 13,2 meses. En el 13% de los casos la supervivencia fue menor de 4 meses, en el 45% fue de 4 a 12 meses, en el 33 % de los casos fue de 13 a 38 meses y en el 9 % de los casos no se conoció su supervivencia.

4.2 Estudio neuropatológico e inmunohistoquímico

El estudio neuropatológico mostró en todos los tumores los criterios morfológicos establecidos para el diagnóstico de GB: alta densidad celular (Figura 20A), heterogenidad morfológica, pleomorfismo nuclear, y anaplasia con pérdida del patrón celular diferenciado. Se detectó la presencia de patrones morfológicos celulares de tipo gemistocítico, oligo like, y/o de célula pequeñas indiferenciadas.

En 10 tumores (casos 1, 6, 9, 21, 22, 24, 26, 33, 35 y 46) se observó la presencia de gemistocitos, células neoplásicas astrocíticas de citoplasma amplio, eosinófilo, denso, mostrando el núcleo excéntrico.

En seis de los casos (4, 8, 9, 10, 16 y 32) se observaron poblaciones celulares de tipo oligo-like. Se consideró esta variante cuando se observó el 15% de la celularidad caracterizada por el núcleo redondeado y citoplasma bien definido, pálido y poligonal.

En tres de los casos estudiados (29, 42 y 43) los tumores mostraban un claro predominio de células pequeñas, con núcleos hiperocrómicos, discretamente polimorfo, escaso citoplasma lo que aportó al tumor un patrón monomorfo de célula indiferenciada.

En dos casos (39 y 40) y con carácter focal se observó la presencia de células gigantes de núcleo irregular, con multinucleación.

En la mayoría de los casos se detectó la presencia de mitosis abundantes (Figura 20B).

Dos de los criterios diagnósticos evidenciados fueron las alteraciones en la vascularización y la necrosis.

La **hiperplasia vascular** con carácter displásico se observó en todos los casos. Los vasos mostraron alteraciones estructurales alterando su forma lineal, formando penachos y estructuras pseudoglomerulares, con una fuerte expresión inmunohistoquímica CD34 (Figura 20C y 20D).

El endotelio apareció hipertrófico, cuboide, con núcleos prominentes y evidentes nucléolos. Presentaban imágenes hiperplásicas y con tendencia a la solidificación. Se acompañó de hiperplasia de las células perivasculares. Aisladamente se observaron figuras mitóticas.

La presencia de **necrosis**, se observó en todos los casos. En general se observaron extensas áreas de necrosis, de contornos irregulares. Estas áreas de necrosis se asociaban con luces vasculares trombosadas (Figura 20E).

Los límites periféricos mostraron acúmulos celulares con tendencia a formar patrones morfológicos de pseudoempalizada. En forma aislada fue posible observar micronecrosis asociadas a pequeños vasos, delimitadas igualmente por pseudoempalizadas (Figuras 20F).

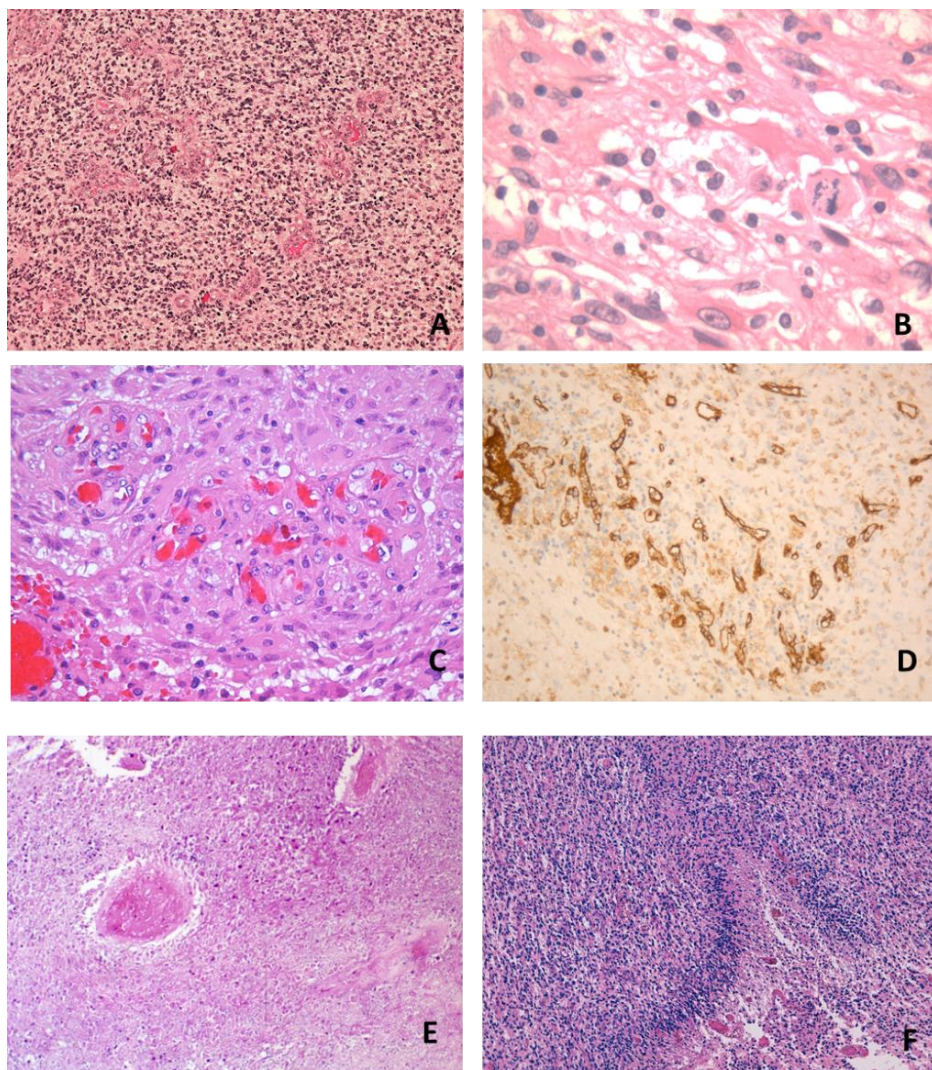


Figura 20: Características histológicas generales del glioblastoma A) Densidad celular alta. Patrón indiferenciado (H.E 10x). B) Patrón astrocitario anaplásico H.E 40x). C) Hiperplasia vascular. Estructuras pseudoglomerulares (H.E 20x). D) Hiperplasia vascular: Inmunotinción CD-34 (10x). E) Necrosis extensas (H.E 10x). F) Necrosis pseudoempalizada (H.E 10x).

Patrones de infiltración

En todos los tumores estudiados se observó infiltración de células neoplásicas en el tejido circundante. Se diferencian dos patrones morfológicos de infiltración: un patrón difuso y un patrón nodular (Tabla 21).

El patrón difuso, viene caracterizado por un límite mal definido en la periferia del tumor. A este nivel la densidad celular decrece de forma progresiva no pudiéndose definir un límite entre el tejido neoplásico y el tejido normal. Este patrón fue observado en 19 casos. (Figura 21A).

El patrón nodular viene caracterizado por un cambio brusco de la densidad celular entre el tumor y el tejido circundante. Este patrón se observó en 9 casos (Figura 21B).

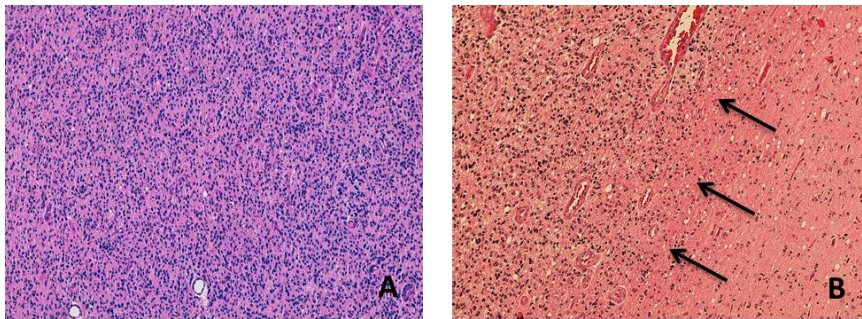


Figura 21. Patrones de infiltración en el glioblastoma con técnicas de H-E. A) Patrón Difuso (20x). B) Patrón nodular (20x), las flechas indican el cambio de densidad celular.

Tabla 21. Estudio de los patrones de infiltración y de los marcadores inmunohistoquímicos en GB. **nv:** no valorable.

Casos	Patrones de infiltración	GFAP	EGFR	p53	Ki67 (%)
1	nv	3	3	0	5
2	difuso	3	3	1	20
3	difuso	3	3	2	8,5
4	difuso	3	3	3	15
5	nv	3	3	0	3
6	difuso	3	3	1	14,5
7	nodular	3	3	3	40
8	difuso	3	3	1	35
9	nv	3	3	1	4
10	nv	3	3	3	30
11	nv	3	2	2	19,7
12	difuso	2	2	2	6
13	nv	3	2	0	8
14	difuso	3	2	3	50
15	difuso	3	3	2	45
16	difuso	3	3	2	22,5
17	nv	3	2	1	5
18	nv	3	2	1	12
19	nv	3	2	1	20
20	nv	3	0	3	43
21	nv	3	1	2	3
22	nv	3	1	1	30
23	difuso	3	0	1	43
24	difuso	3	0	3	22
25	difuso	3	2	1	6,8
26	difuso	3	0	1	3
27	nodular	3	1	1	2
28	nodular	3	1	2	3
29	nodular	3	1	3	1
30	nv	3	1	0	30
31	difuso	3	0	1	12
32	difuso	3	0	1	5
33	nodular	3	0	2	2
34	nv	3	0	4	26
35	difuso	3	0	2	23
36	nodular	3	2	3	44
37	nodular	2	1	1	3
38	nodular	2	0	1	2
39	difuso	3	1	3	2
40	difuso	3	2	3	7,5
41	nodular	3	0	3	2
42	difuso	2	0	0	1
43	nv	2	0	0	5
44	nv	3	2	0	1
45	nv	2	0	0	1
46	nv	3	0	0	2

El estudio inmunohistoquímico se orientó hacia el diagnóstico y caracterización de los tumores. Este estudio fue realizado sobre cuatro muestras aleatorias del tumor, en cada uno de los casos, sobre matrices tisulares. Los valores se indican en la tabla 21.

Expresión de GFAP. Fue positiva en el citoplasma de las células neoplásicas en los 46 tumores. La expresión de GFAP fue heterogénea entre tumores y dentro del mismo tumor. En el 91% de los 46 casos estudiados, la expresión fue valorada con un nivel 3, correspondiente a más del 75% de la población tumoral; en el 9% de los tumores, fueron valorados con un nivel 2 que corresponde a una expresión mayor del 10% y menor del 75% de la población celular (Figura 22A). No se detectaron tumores con menos del 10% de las células con expresión positiva.

Expresión de CD34. Los patrones de vascularización, hiperplasia endotelial, estructuras pseudoglomerulares se observaron en todos los tumores con la expresión positiva de CD34 a nivel de endotelios.

Expresión de EGFR. Se ha observado la positividad de este receptor en la membrana celular y prolongaciones. La expresión fue variable entre los tumores y dentro del mismo tumor, mostrando en el 28% de los casos, un nivel de expresión alto, nivel 3. En el 21% un nivel de expresión intermedio, nivel 2. En el 18%, la expresión fue focal, en células aisladas, con un nivel 1. En el 33%, la expresión de EGFR fue negativa, identificándose con un nivel de expresión 0 (Figura 22B).

Expresión de p53. Se observó a nivel nuclear, dando como resultado que en el 26% de los casos, se detectó expresión positiva con un nivel 3, correspondiente a más del 50% de las células neoplásicas; en el 20%, el nivel de expresión fue 2, correspondiente a un 25-50% de las células; y con un nivel 1, correspondiente a menos del 25% de las células se observó en el 34% de los casos. En el 20%, la expresión de p53 fue focal o negativa (Figura 22C).

Expresión de Ki67/MIB-1. Se observó que un 25% de los casos mostraron un índice de Ki67 del 25% al 50% con una media del 37,8%, en el 34% presentaron un índice de Ki67 entre el 5 y el 25%, con una media de expresión del 14,5 y en el 43% de los casos fue menor del 5% con una media de expresión del 2,7% en las células neoplásicas (Figura 22D).

En el estudio inmunohistoquímico de los tumores se observó la gran heterogeneidad, no solo entre tumores, sino también intratumoral.

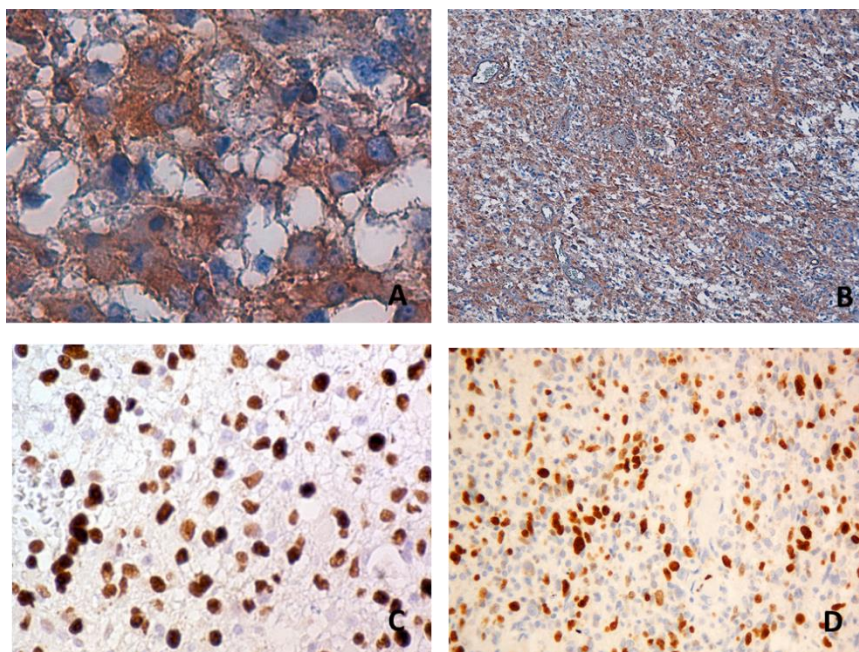


Figura 22: Expresión inmunohistoquímica en los GB. A) Expresión citoplásmica GFAP (40x). B) Expresión de EGFR (10x). C) Expresión nuclear de p53 (40x). D) Expresión nuclear de Ki67 (20x).

4. 3 Estudios genéticos y epigenéticos.

Se ha realizado la caracterización genética y epigenética de los 46 tumores primitivos de glioblastoma primario. Se ha estudiado la amplificación de *EGFR* mediante FISH, siendo esta técnica la que nos ha servido para incluir la serie de nuestros casos en tres grupos distintos según el estatus de este gen. Se ha analizado también este gen mediante PCR. Se analizó la variación en el número de copias y el estudio de metilación mediante las técnicas MLPA y MS-MLPA en diferentes kits de genes. Así mismo se ha realizado el estudio de miRNAs mediante técnicas de arrays. Los resultados de los miRNAs están ligados al modelo experimental realizado en esta tesis.

4.3.1 Amplificación de *EGFR*

Se analizaron por **hibridación *in situ* de fluorescencia** los 46 casos de glioblastoma. Se analizó el estatus de amplificación de *EGFR*, y la presencia de trisomías o polisomías del cromosoma 7, en tejido incluido en parafina sobre matrices tisulares.

Los resultados obtenidos mostraron que el 65% de los casos estudiados presentaron amplificación de *EGFR* con diferentes niveles de amplificación (Tabla 22).

Basándonos en el nivel de amplificación de *EGFR* hemos dividido los casos en tres grupos:

Grupo H-amp. Alto nivel de amplificación (casos 1-20): el 43% de los casos se incluyeron en este grupo. En ellos se observó un alto número de copias por núcleo en el 15%-100% de sus células (Figura 23A). En 12 casos se observó este tipo de amplificación en más del 60% de los núcleos (valorado como grado 3 de amplificación); en 7 casos una amplificación entre el 15-60% de los núcleos (valorado como grado 2 de amplificación); y el caso 20 presentó la particularidad de un gran número de copias por núcleo pero en células aisladas.

El tipo de amplificación de *EGFR* en este grupo correspondería a la descrita como dobles minutos (dmin)^{4, 27, 163, 186, 187 282}.

Grupo L-amp. Bajo nivel de amplificación (casos 21-30): el 22% de los casos se incluyen en este grupo. En ellos se observó un bajo número de copias de *EGFR* en un número no superior al 15% de las células (Figura 23 B). Estos casos se clasifican como un grado 1 de amplificación.

El tipo de amplificación de *EGFR* en este grupo corresponde a la presencia de copias extras de este gen insertadas en los brazos p y q del cromosoma^{187, 186}.

Grupo N-amp. No amplificación (casos 31-46): el 35% de los casos se incluyen en este grupo y no presentaron amplificación de *EGFR* (Figura 23 C). Estos casos sin amplificación se han valorado con un grado 0.

Estatus de cromosoma 7. Se observaron trisomías (T) en el 100% de los casos y presencia de trisomías junto con polisomias (P) en 22 casos (47%) (Tabla 22). Las polisomías se distribuyeron de la siguiente manera: En el

grupo H-amp en el 35% de los casos, en el grupo L-amp en el 100%, y en el grupo N-amp en el 31% de los casos.

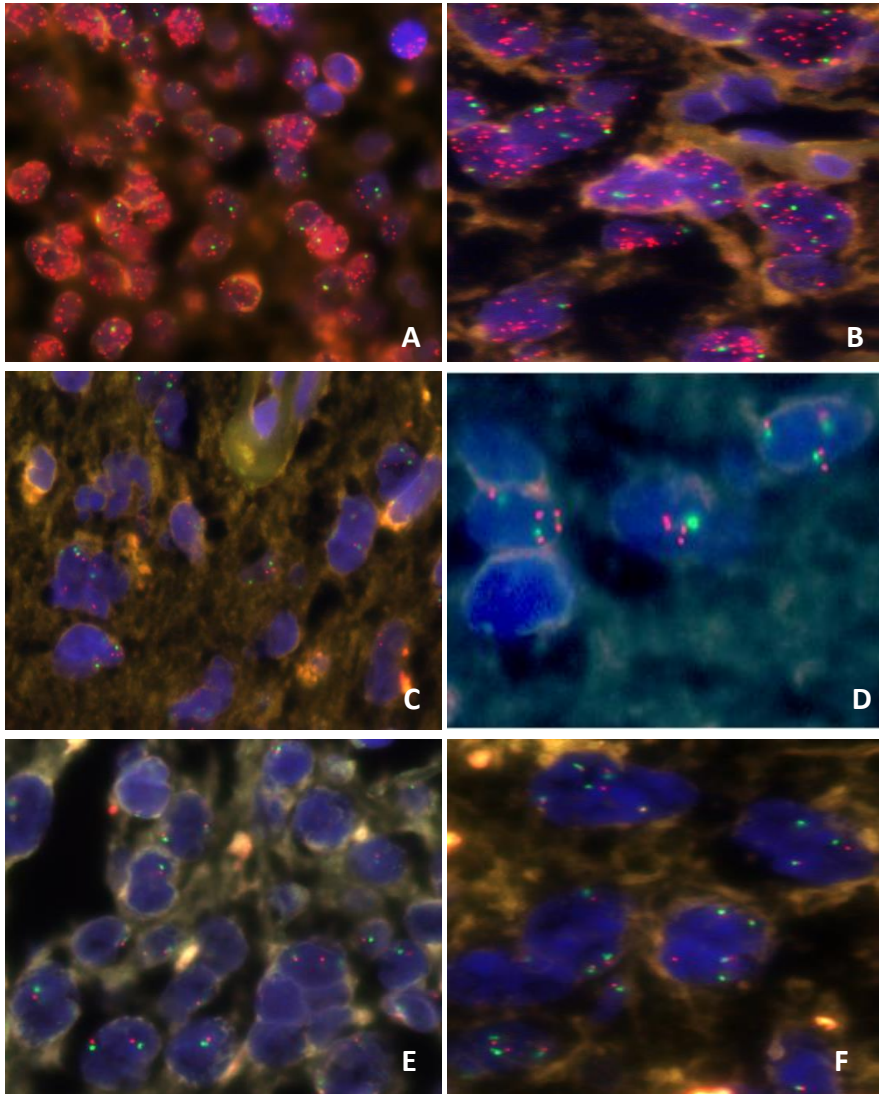


Figura 23. Amplificación de *EGFR* analizado por FISH. A) y B): Alto nivel de amplificación (100x). **C) y D):** Bajo nivel de amplificación (100x). **E) y F):** No amplificación (100x). Núcleos con trisomías en el cromosoma 7 en la figura B (100x). Núcleos con polisomías en el cromosoma 7 en la figura F (100x). Las señales rojas corresponden a *EGFR*, las señales verdes al centrómero del cromosoma 7, y en color azul se tiñen los núcleos con dapi.

Tabla 22. Estudio de *EGFR/CEP-7* por FISH. H-amp: alto nivel de amplificación, L-amp: bajo nivel de amplificación, N-amp: no amplificación. T: trisomías del cromosoma 7. P: polisomías del cromosoma 7.

Casos	FISH	CEP-7	Grado de amplificación
1	H-amp	T	2
2	H-amp	T	3
3	H-amp	T	3
4	H-amp	T	2
5	H-amp	T	2
6	H-amp	T/P	3
7	H-amp	T	3
8	H-amp	T/P	2
9	H-amp	T/P	3
10	H-amp	T	3
11	H-amp	T	3
12	H-amp	T/P	2
13	H-amp	T/P	2
14	H-amp	T	3
15	H-amp	T	3
16	H-amp	T	3
17	H-amp	T	2
18	H-amp	T/P	3
19	H-amp	T/P	3
20	H-amp	T	1
21	L-amp	T/P	1
22	L-amp	T/P	1
23	L-amp	T/P	1
24	L-amp	T/P	1
25	L-amp	T/P	1
26	L-amp	T/P	1
27	L-amp	T/P	1
28	L-amp	T/P	1
29	L-amp	T/P	1
30	L-amp	T/P	1
31	N-amp	T	0
32	N-amp	T	0
33	N-amp	T	0
34	N-amp	T/P	0
35	N-amp	T	0
36	N-amp	T/P	0
37	N-amp	T	0
38	N-amp	T	0
39	N-amp	T/P	0
40	N-amp	T/P	0
41	N-amp	T	0
42	N-amp	T/P	0
43	N-amp	T	0
44	N-amp	T	0
45	N-amp	T	0
46	N-amp	T	0

4.3.1.1 Estatus del *EGFR* mediante PCR diferencial

El estudio mediante PCR diferencial permitió analizar de manera cualitativa y cuantitativa la amplificación del gen *EGFR*. De los 46 casos estudiados se escogieron 23 casos de los tres grupos de amplificación de este gen analizados por FISH. Los casos 1, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 12 y 20 del grupo H-amp, los casos 21, 22, 23 y 24 del grupo L-amp, y los casos del 31 al 40 del grupo N-amp.

Se detectó la amplificación del *EGFR* en 8 casos, todos ellos correspondientes a los casos incluidos en el grupo H-amp con excepción del caso 20 que formando parte del grupo H-amp no presentó amplificación que pudiera ser detectada por PCR. Los 15 casos restantes no presentaron amplificación del gen que pudiera detectarse en la PCR, correspondiendo a los casos incluidos en los grupos L-amp y N-amp (Figura 24 A, B y C).

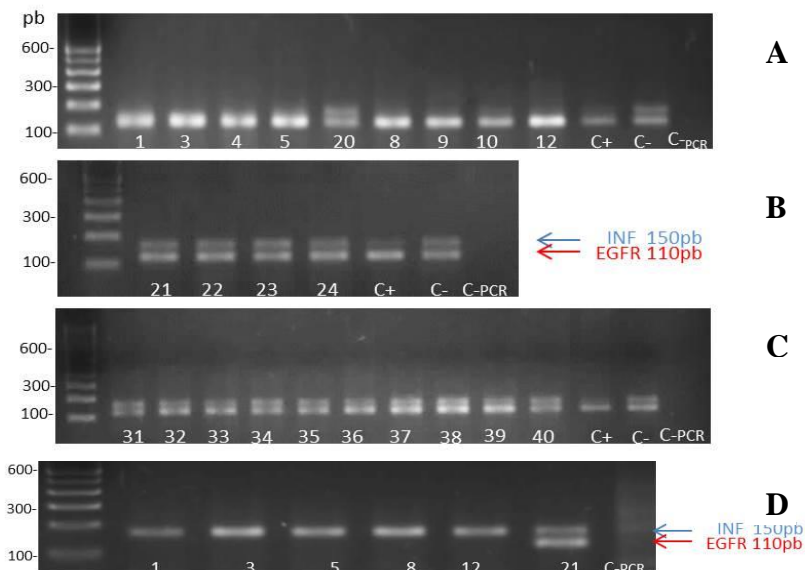


Figura 24: PCR diferencial en GB. A) Casos del grupo H-amp. **B)** Casos del grupo L-amp. **C)** Casos del grupo N-amp. **D)** Se observa en el gel de referencia la banda correspondiente al gen *INF* que no puede ser identificada en la figura A, debido a la amplificación del gen *EGFR*. Se utilizaron como control positivo una muestra de cáncer de pulmón con amplificación de *EGFR*, y como control interno, el interferón, *INF*.

Esté método no fue capaz de detectar la baja amplificación del gen *EGFR* en los casos del grupo L-amp.

4.3.1.2 Amplificación de *EGFR* por FISH relacionada con la expresión inmunohistoquímica de la proteína EGFR

Con respecto a la expresión de EGFR en los casos con diferentes niveles de amplificación de *EGFR*, se observó, que en el grupo H-amp todos los casos presentaron sobreexpresión de la proteína detectada por inmunohistoquímica (grados 2 y 3), con excepción del caso 20 que presentó amplificación de *EGFR* solo en células aisladas y en el que no fue detectada la expresión de la proteína EGFR.

En el grupo L-amp todos los casos excepto uno, que presentaba sobreexpresión (caso 25), presentaban un grado bajo de expresión de la proteína EGFR, o ninguna expresión.

En el grupo N-amp tres casos presentaron sobreexpresión de EGFR. El resto de casos mostraron un nivel bajo de expresión de la proteína o una expresión negativa.

Estos resultados se detallan en la tablas 21 y 22 y en la figura 25.

La correlación entre el estado de amplificación del gen *EGFR*, y la expresión inmunohistoquímica de la proteína EGFR fue estadísticamente muy significativa ($p = 4.3E^{-6}$) según el test de Chi-cuadrado. Pero debido a los valores pequeños y al tamaño muestral se realizó el coeficiente de asociación gamma de Goodman and Kruskal, obteniéndose un valor de 0.819, con un intervalo de confianza al 95% (0.693, 0.946). Se evidencia una alta asociación.

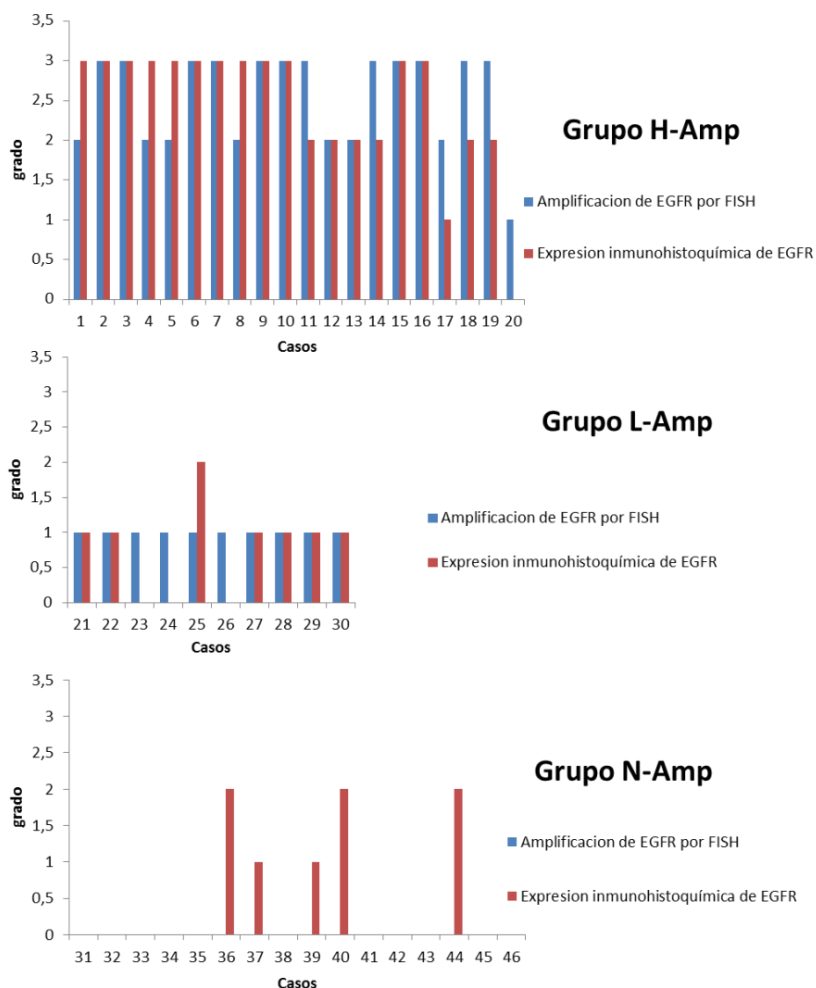


Figura 25. Análisis comparativo entre la amplificación de *EGFR* por FISH y la expresión de la proteína EGFR detectada por inmunohistoquímica

4.3.1.3 Parámetros clínicos e histopatológicos en los diferentes grupos de amplificación de *EGFR*

En el grupo con alto nivel de amplificación de *EGFR* (H-amp) la incidencia del tumor por sexos fue similar en hombres y en mujeres, 10 pacientes eran mujeres y 10 pacientes eran hombres, mientras que en los

grupos con bajo nivel de amplificación (L-amp) y en el de sin amplificación (N-amp) fue superior en hombres que en mujeres; en el grupo L-amp se detectó el tumor en 8 hombres y 2 mujeres y en el grupo N-amp en 11 hombres y 5 mujeres.

La edad media de los pacientes fue superior en el grupo H-amp (62 años) con respecto al grupo N-amp (60 años), a diferencia del grupo L-amp que fue inferior, con una media de edad de 50 años.

La localización del tumor fue variable en los tres grupos. En el grupo H-amp el tumor se localizaba principalmente en la región temporal, seguido de la región frontal, de la región parietal, de la región occipital y por último del cuerpo caloso. En el grupo L-amp se localizaba en la región parietal, seguido de la región temporal. En el grupo N-amp la localización del tumor fue equitativa entre las regiones frontal, temporal y parietal, y menor incidencia en la región occipital.

El síntoma inicial predominante fue el HTIC en los grupos H-amp y N-amp, y el déficit neurológico en el grupo L-amp. La duración del síntoma inicial (DSI) fue igual en los grupos H-amp y L-amp, con una media de 13 días y en el grupo N-amp con una duración de 11 días.

El índice de Karnofsky predominante en los grupos H-amp y L-amp fue 70, a diferencia del grupo N-amp que fue 90.

El tamaño del tumor fue mayor en los casos del grupo H-amp con una media de 4,2 cm, seguido del grupo L-amp con un tamaño de 3,7 cm y finalmente del grupo N-amp con una media de 3,2 cm.

El tratamiento principal en el 100% de los casos de todos los grupos fue la cirugía y como tratamiento adyuvante predominó la RT+QT en los grupos H-amp y N-amp y la RT en el grupo L-amp.

La supervivencia de los pacientes, en los diferentes grupos fue la siguiente: en el grupo H-amp la media de supervivencia fue de doce meses, en el grupo L-amp alrededor de los trece meses, mientras que en el grupo N-amp la media fue algo superior, alrededor de los catorce meses.

Con respecto a los patrones de infiltración se observó que el patrón nodular apareció preferentemente en los grupos L-amp y N-amp. Solo un caso con este patrón se presentó en el grupo H-amp.

La media de expresión de la proteína GFAP en todos los grupos fue de grado 3. Con respecto al Ki-67, el grupo H-amp fue de 20,3% superior a la

media del grupo L-amp (14,4%) y a la media del grupo N-amp que presentó un índice de Ki-67 muy inferior, de 8,7%. En los tres grupos la expresión de la proteína nuclear p53 fue variable. La media de expresión de p53 en los diferentes grupos fue de 25%, 20% y 31% de las células respectivamente.

El análisis estadístico: Entre las variables cuantitativas (edad, IK, DSI, tamaño, supervivencia y Ki67), el IK y el Ki67 fueron estadísticamente significativos entre los tres grupos (H-amp, L-amp, N-amp), con un $p=0,001$ en el IK, y un $p=0,01$ en el Ki67, al nivel de significación habitual $p=0,05$ mediante el test de Kruskal Wallis (Apéndice II, tabla 1).

Entre las variables dicotómicas (sexo, presencia de trisomías y polisomías del cromosoma 7), solo la presencia de polisomías resultó ser muy significativa en el grupo L-amp con respecto a los otros dos grupos del estudio con un $p=0,006$ usando el test Chi-cuadrado (Apéndice II, tabla 2).

Entre las variables cualitativas (localización, síntoma inicial, tratamiento, patrones de infiltración) no fueron aplicables los métodos estadísticos por ser cohortes pequeñas, tan solo aplicando las tablas de contingencia y las tablas de frecuencias relativas, se observó que para el parámetro de patrones de infiltración, el patrón nodular se presentó con frecuencias relativas del 30% en los grupos L-amp y N-amp, frente al 5% en el grupo H-amp.

Se estudió la supervivencia como variable independiente, analizando estadísticamente los casos con una evolución menor de 14 meses y los casos con una evolución superior a 14 meses, y analizando el resto de variables comparativamente entre estos dos grupos. La supervivencia en cada uno de los grupos según la amplificación de *EGFR* no mostró valores significativos a nivel estadístico con $p=0,9$.

Del estudio clínico, el tamaño del tumor fue estadísticamente significativo según el test no paramétrico de Wilcoxon, con $p=0,01$. La edad a pesar de no ser significativa a nivel estadístico ($p=0,08$) se pudo observar una diferencia marcada entre el grupo con una evolución menor de 14 meses presentándose una media de edad de 62,2 años y el grupo con mayor evolución superior a 14 meses que presentó una media de edad de 57,4 años. El resto de variables clínicas no mostraron diferencias significativas apreciables.

4.3.2 Resultados del estudio genético y de metilación obtenidos con el análisis por MLPA y MS-MLPA

Para este estudio se utilizaron dos kit diferentes:

-MLPA probemix P105-D1 Glioma-2 Salsa MLPA KIT

-ME001-C2 Tumor suppressor -1

El estudio de la variación en el número de copias (VNC), se ha realizado en los dos kits, y el estudio de la metilación en el kit de genes supresores. La relación de genes y su función se detallan en el Apéndice I y IV.

4.3.2.1 Estudio en la variación en el número de copias

Con el **kit MLPA probemix P105-D1 Glioma-2** se han estudiado las VNC en los genes que participan en tres vías de señalización importantes dentro de Glioblastoma: **la ruta RAS/PI3K** con los genes *EGFR* (7p11.2), *PDGFRA* (4q12) y *PTEN* (10q23.31), **la ruta de p53** con los genes *CDKN2A* (9p21.3), *MDM2* (12q15), *TP53* (17p13.1), y **la ruta RB** con los genes *CDKN2A* y *CDK4* (12q14.1). Además se han estudiado los genes *NFKBIA* (14q13.2) y *MIR26A2* (12q14.1) incluídos en este kit. Los exones estudiados en cada gen aparecen descritos en la tabla 23. En este estudio se ha excluído el caso número 13 por insuficiencia de material.

Tabla 23. Genes del MLPA probemix P105-D1 Glioma-2 Salsa MLPA KIT.

Genes	Exones estudiados
<i>EGFR</i>	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 13, 18, 25
<i>PDGFRA</i>	3, 5, 22
<i>CDKN2A</i>	1, 2a, 3, 5
<i>PTEN</i>	1, 2, 3, 4, 5, 6,7 ,8, 9
<i>CDK4</i>	4, 8
<i>MDM2</i>	3, 11
<i>MIR26A2</i>	1
<i>NFKBIA</i>	3, 4, 5
<i>TP53</i>	1, 2a, 3, 4b, 5, 7, 10, 11

Análisis del gen *EGFR*

El estudio de la VNC del gen *EGFR*, se presentó en su estatus normal (dos copias), o un aumento de ellas. La distribución de estas alteraciones en los tres grupos obtenidos por FISH fue la siguiente:

Grupo H-amp (casos del 1 al 20): Se observó que en 15 casos el aumento en el número de copias fue alta (cuantificación: entre 4, 9 y 30,5) en todos los exones; en tres casos también fue alta en parte de los exones; y en el caso 20 solo el exón 2 presentaba un alto número de copias.

Grupo L-amp (casos del 21 al 30): Todos los casos excepto uno, presentaron un aumento bajo en el número de copias en todos los exones (cuantificación: entre 1,4 y 2,8), o en parte de ellos juntamente con exones con un número de copias normal (cuantificación entre 0,9 y 1,2). De estos casos, sólo dos casos presentaron un alto número de copias en un solo exón. Además, un caso presento un número de copias normal en todos sus exones.

Grupo N-amp (casos del 31 al 46): Seis casos presentaron un número de copias normal, y los otros ocho casos presentaron, junto al estatus normal del gen, un aumento bajo en el número de copias en algunos de sus exones.

Todos estos datos se muestran en la tabla 24.

Con estos resultados se observa que al relacionar el análisis del número de copias de *EGFR* con los tres grupos de amplificación establecidos por FISH (H-amp, L-amp, N-amp), todos los casos del grupo H-amp (excepto el caso 20), tenían un alto número de copias de *EGFR* en todos o en parte de sus exones. Por otra parte, tanto en el grupo L-amp y N-amp el número de copias de *EGFR* fue normal o con un aumento bajo de copias de este gen, en todos o en parte de sus exones, por lo que el análisis con MLPA no pudo discriminar los casos incluidos en cada uno de estos dos grupos.

Mediante el estudio con MLPA se ha podido detectar la presencia de *EGFRvIII* mutante. Se identificó mediante la evaluación de la media del número de copias de los exones 2-7 comparándola con la media de los exones 1, 8, 13, 17 y 22, y realizando el cociente. Se consideraron casos con la variante *EGFRvIII*, cuando el ratio del cociente fue por debajo de 0,8. Los casos con *EGFRvIII* fueron el: 2, 3, 4, 6, 7, 8, 14, 15 y 16. Todos los casos con la variante mutante *EGFRvIII* estaban incluidos dentro del grupo con un alto grado de amplificación de *EGFR* (grupo H-amp).

Tabla 24. Análisis del número de copias en los exones de *EGFR* por MLPA en los tres grupos del estatus de amplificación de *EGFR*. **h:** Aumento elevado en el número de copias; **l:** Bajo aumento en el número de copias; **n:** estatus normal del gen.

Caso/Exon	1	2	3	4	5	6	7	8	13	18	25
1	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h
2	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h
3	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h
4	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h
5	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h
6	h	l	l	l	l	l	l	h	h	h	h
7	h	l	l	l	l	l	l	h	h	h	h
8	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h
9	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h
10	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h
11	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h
12	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h
14	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h
15	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h
16	h	h	h	l	l	l	l	h	h	h	h
17	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h
18	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h
19	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h
20	l	h	l	l	l	l	l	l	l	l	l
21	l	l	l	l	n	n	n	n	n	n	n
22	h	l	l	l	n	l	l	l	l	l	l
23	l	l	l	l	n	n	n	n	l	l	n
24	l	h	l	l	l	l	l	l	l	l	l
25	l	l	l	l	l	l	l	l	l	l	l
26	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
27	l	l	l	l	l	l	l	l	l	l	l
28	n	l	l	l	n	n	n	n	n	n	n
29	l	l	l	l	l	l	l	l	l	l	l
30	l	l	n	n	l	l	l	n	l	l	n
31	l	n	n	n	l	l	n	l	l	n	n
32	l	l	l	l	n	n	l	l	n	n	l
33	l	l	l	l	l	l	l	l	l	l	l
34	l	l	l	n	n	n	n	n	n	n	n
35	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
36	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
37	l	n	n	l	l	l	l	n	n	n	n
38	n	l	l	l	n	n	n	l	l	l	n
39	n	l	l	n	n	n	n	l	n	l	n
40	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
41	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
42	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
43	l	l	n	l	l	l	l	l	l	l	l
44	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
45	n	n	l	l	n	n	n	n	n	n	n
46	n	n	l	l	n	n	n	n	n	n	n

Análisis del gen *PTEN*

La variación en el número de copias de *PTEN* se observó de tres formas: delección en homocigosis, delección en heterocigosis y delección en heterocigosis en algunos de sus exones (heterocigosis parcial).

En cuanto a la distribución de estas alteraciones, se observó que la delección de *PTEN* estuvo presente en el 45%, 50% y 25 % de los grupos H-amp, L-amp y N-amp respectivamente (Tabla 25). La delección en heterocigosis fue la alteración más frecuente en los tres grupos estudiados.

Grupo H-amp. La delección en heterocigosis la presentaron 7 casos, todos ellos con una delección en heterocigosis parcial, con excepción del caso 11 que presentó todos sus exones en heterocigosis. Dos casos presentaron una delección en homocigosis. El resto de casos no presentaron alteración en el gen *PTEN*.

Grupo L-amp. Cuatro casos mostraron delección en heterocigosis, uno de ellos fue parcial. Un caso mostró una delección homocigótica, y el resto de casos no presentaron ninguna alteración.

Grupo N-amp. Tres casos presentaron una delección en heterocigosis, siendo ésta de carácter parcial en uno y completa en los otros dos. En un caso se observó delección en homocigosis y el resto de casos de este grupo no presentaron ninguna alteración en este gen.

En conjunto, alteraciones en *PTEN* se encontraron en el 39% de los casos estudiados, de ellos el 30% en heterocigosis y el 9% en homocigosis.

Análisis del gen *MDM2*

La variación en el número de copias de *MDM2* se presentó de tres formas: delección en homocigosis parcial, delección en heterocigosis total o parcial y amplificación (Tabla 25).

En cuanto a la distribución de estas alteraciones en los tres grupos, fue la siguiente:

Grupo H-amp. El 35% de los casos presentaban alteración en *MDM2*. Cuatro casos presentaron una delección en heterocigosis parcial, un caso una delección en homocigosis parcial y dos casos presentaron amplificación.

Grupo L-amp. Solamente un caso, presentó delección en heterocigosis parcial.

Grupo N-amp. El 25% de los casos presentaron alteraciones en *MDM2*. Cuatro casos mostraron delección en heterocigosis, uno de ellos parcial.

En conjunto, alteraciones en este gen se encontraron en el 26% de los casos estudiados.

Análisis del gen *CDK4*

La variación en el número de copias de *CDK4* se presentó en forma de delección heterocigótica y homocigótica conjuntamente, pero en exones distintos; delección heterocigótica parcial; y amplificación. (Tabla 25).

En cuanto a la distribución de estas alteraciones en los tres grupos, fue la siguiente:

Grupo H-amp. Un caso presentó en la mitad de los exones estudiados una delección en homocigosis y en la otra mitad una delección en heterocigosis, dos casos presentaron heterocigosis parcial, y un caso presentó amplificación.

Grupo L-amp. Solo un caso presentó delección en heterocigosis de forma parcial.

Grupo N-amp. Dos casos presentaron una delección en heterocigosis parcial, el resto de casos no presentaron alteraciones.

En conjunto, el 15% de los casos del estudio presentó alterado el gen *CDK4*.

Análisis del gen *TP53*

La variación en el número de copias de *TP53* se presentó en forma de delección heterocigótica total o parcial, y delección homocigótica parcial (Tabla 25).

En cuanto a la distribución de estas alteraciones en los tres grupos, fue la siguiente:

Grupo H-amp. Cuatro casos presentaron heterocigosis en *TP53*, y un caso presentó homocigosis parcial.

Grupo L-amp. Dos casos presentaron delección en heterocigosis de *TP53*, uno total y el otro parcial.

Grupo N-amp. En este grupo se observaron el mayor número de alteraciones de este gen, delección en heterocigosis en cinco casos, uno de

ellos parcial; otro caso presentó una delección homocigótica en este gen; y el resto de casos no presentaron alteración en el gen *TP53*.

En conjunto, el 28% de los casos del estudio presentó alterado el gen *TP53*.

Análisis del gen *NFKBIA*

La variación en el número de copias de *NFKBIA* se presentó solo en forma de delección heterocigótica total (Tabla 25).

En cuanto a la distribución de estas alteraciones en los tres grupos obtenidos con respecto a la amplificación de *EGFR* fue la siguiente:

Grupo H-amp. Tres casos presentaron heterocigosis.

Grupo L-amp. Sólo un caso presentó delección en heterocigosis.

Grupo N-amp. Tres casos mostraron delección en heterocigosis.

En conjunto, el 15% de los casos del estudio presentó alterado el gen *NFKBIA*.

Análisis del gen *MIR26A2*

El gen sólo presentó una delección en heterocigosis total en un caso dentro del grupo de los casos que no presentaban amplificación de *EGFR* (Tabla 25).

Análisis del gen *PDGFRA*

El estudio del gen, no mostró ningún tipo de delección en ninguno de los tres grupos (Tabla 25).

Los porcentajes de alteraciones de los distintos genes en los tres grupos de amplificación de *EGFR* se detallan en la tabla 29. De forma general, en los grupos con amplificación de *EGFR* (H-amp y L-amp) el gen *PTEN* presentó mayor frecuencia de alteración que el grupo sin amplificación de *EGFR*. El gen *CDK4* se alteró con mayor frecuencia en el grupo H-amp. En cuanto a los genes *TP53* y *NFKBIA* se observó mayor frecuencia de alteraciones en el grupo N-amp que en los grupos H-amp y L-amp.

En este kit, **MLPA probemix P105-D1 Glioma-2**, se tuvieron en cuenta los siguientes genes de referencia: *SCN1A* (2q24.3), *RYBP RAB7A* (3q21), *IL4* (5q31), *PKHD1* (6p12.2), *CHD7* (8q12.2), *MYBPC3* (11p11.2), *OCA2* (15q13.1), *HIRIP3* (16p11.2), *MYO5B* (18q21.1), *SAMHD1* (20q11.23) y *LARGE* (22q12.3).

En algunos genes de referencia del kit que se detallan a continuación, se detectó una delección en heterocigosis total (tabla 26).

El gen *OCA2* se encontró deleccionado en el 17% de los casos, todos ellos en los grupos H-amp y L-amp.

El gen *SAMHD1* se presentó alterado en el 30% de los casos. El mayor número de casos afectados se observó en el grupo H-amp con 6 casos. En el grupo L-amp se presentaron 4 casos con delección heterocigótica de este gen, y también el grupo N-amp presentó 4 casos con la misma alteración.

El gen *MYBPC3* presentó delección en el 33% de los casos, destacando que el mayor número de alteraciones se observó en el grupo H-amp con 19 casos, seguido del grupo N-amp con 4 casos y finalmente el grupo L-amp con 2 casos.

El gen *LARGE* se presentó alterado en un 33% de los casos del estudio. La mayoría de los casos afectados se observaron en el grupo H-amp con 11 casos. En el grupo L-amp la presentaron tres casos, y en el grupo N-amp, se observó en un caso.

Los porcentajes de alteraciones de los distintos genes en los tres grupos de amplificación de *EGFR* se detallan en la tabla 30. Del análisis de todos estos genes se observó que el gen *LARGE* presentó mayor frecuencia de alteración en los grupos con amplificación de *EGFR*.

El siguiente kit a estudio fue **MLPA KIT ME001-C2 Tumor suppressor -1**.

En este kit se estudiaron 26 sondas para MLPA correspondiente a 24 genes supresores de tumores que fueron *CDKN2A*, *CDKN2B*, *PTEN*, *VHL*, *GSTP1*, *CASP8*, *FHIT*, *APC*, *CDH13*, *TIMP3*, *BRCA1*, *TP73*, *DAPK1*, *CD44*, *IGSF4*, *CHFR*, *RASSF1*, *MLH1*, *ATM*, *BRCA2*, *ESR*, *RARB*, *HIC1* y *CDKN1B*. También se analizaron 15 pruebas de referencia. Los casos 7 y 41 no fueron analizados por falta de material.

De todos los genes supresores estudiados, los genes *CDKN2A*, *CDKN2B*, *VHL*, *GSTP1*, *CASP8*, *FHIT*, *APC*, *CDH13*, *TIMP3* y *BRCA1*, presentaron alguna alteración en el número de copias en los casos estudiados (Tabla 27).

Análisis del gen *CDKN2A*

El gen *CDKN2A* se presentó alterado en el 52% de los casos. En 14 casos se observó una delección en homocigosis y en 10 casos una delección en heterocigosis.

Grupo H-amp. Quince casos presentaron alteraciones de ellos 9 casos una delección homocigótica y 6 casos delección en heterocigosis.

Grupo L-amp. Cuatro casos presentaron alteración en el gen, tres casos presentaron una delección en homocigosis y un caso una delección en heterocigosis.

Grupo N-amp. Cinco casos presentaron alteración, dos casos delección homocigótica y tres tenían delección heterocigótica.

Análisis del gen *CDKN2B*

En el gen *CDKN2B* se observaron alteraciones en el 50% de los casos estudiados. En 13 casos se identificó una delección homocigótica y en 10 casos una delección heterocigótica.

Grupo H-amp: 14 casos estuvieron alterados y en 9 de estos se identificó una delección en homocigosis y en 5 casos en heterocigosis.

Grupo L- amp: Cuatro casos presentaron alteración en el gen, tres casos presentaron una delección en homocigosis y uno una delección en heterocigosis.

Grupo N- amp: un caso presento delección en homocigosis y cuatro casos presentaron delección heterocigótica.

Análisis del gen *VHL*

El gen presentó alteraciones en 33% de los casos, en todos ellos se observó una delección en heterocigosis total, con excepción de un caso que tenía una delección en homocigosis. En el **grupo H-amp** seis casos presentaron delección heterocigótica y un caso presentó delección en homocigosis. En los grupos **L-amp** y **N-amp** se observaron cuatro casos en cada grupo con delección en heterocigosis.

Análisis del gen *GSTP1*

El gen presentó delección en heterocigosis en el 30% de los casos. En el **grupo H-amp** se detectó esta alteración en 6 casos, en el grupo **L-amp** en 3 casos, y en el grupo **N-amp** en 5 casos.

Análisis del gen *CASP8*

El gen presentó delección en heterocigosis en el 9% de los casos. Esta alteración estuvo presente en el **grupo H-amp** en dos casos, en los grupos **L-amp** y **N-amp** en un caso en cada grupo.

Análisis del gen *FHIT*

El gen presentó delección en heterocigosis total en el 11% de los casos. Esta alteración se detectó en dos casos del grupo **H-amp**, en dos casos en el grupo **L-amp** y en un caso en el grupo **N-amp**.

Análisis del gen *APC*

El gen se encontró delecionado en heterocigosis en el 9% de los casos del estudio. Esta alteración se detectó en dos casos del grupo **H-amp** y en un caso de los grupos **L-amp** y **N-amp**.

Análisis del gen *CDH13*

En el gen se identificó la delección en heterocigosis en el 11% de los casos. Presentó esta alteración un caso del grupo **H-amp**, tres casos del grupo **L-amp** y un caso del grupo **N-amp**.

Análisis del gen *TIMP3*

El gen presentó en el 9% de los casos una delección en heterocigosis. En el grupo **H-amp** se identificaron dos casos con esta alteración, en el grupo **L-amp** un solo caso, así como otro caso en el grupo **N-amp**.

Análisis del gen *BRCA1*

Solo en el 4% de los casos se observaron alteraciones, en concreto, delección en heterocigosis. Los dos casos pertenecían al grupo **H-amp**.

Los porcentajes de alteraciones de los distintos genes supresores en los tres grupos de amplificación de *EGFR* analizados se detallan en la tabla 31. Los genes más afectados en los casos estudiados fueron *CDKN2A*, *CDKN2B*, *VHL* y *GSTP1*.

Con respecto a los genes *CDKN2A* y *CDKN2B*, en el grupo H-amp se detectaron alteraciones en la mayoría de los casos (75%), mientras que en los grupos L-amp y N-amp en menos de la mitad de los casos (40% y 31% respectivamente), siendo superior está alteración en los casos del grupo L-amp con respecto al N-amp.

En este kit se estudiaron 15 genes de referencia *CREM*, *PARK2*, *TNFRSF1A*, *MLH3*, *PAH*, *BCL2*, *TSC2*, *CDK6*, *CDH1*, *AI651963*, *KLK3*, *BRCA2*, *CD27*, *CTNNB1* y *CASR*.

De ellos, en los tumores objeto de estudio, se detectaron alteraciones en los genes, *CREM*, *CDH1*, *PAH*, *BCL2*, *PARK2*, *BRCA2*, *CD27* y *MLH3* (Tabla 28).

Análisis del gen *CREM*

En el 33% de los casos se observó alteraciones en este gen. En el grupo **H-amp** se detectó un caso con delección en homocigosis y 6 casos presentaron delección en heterocigosis. En los grupos **L-amp** y **N-amp** 4 casos presentaron delección en heterocigosis en cada uno de los grupos.

Análisis del gen *CDH1*

El gen presentó delección en heterocigosis en el 35% de los casos. En el grupo **H-amp**, 6 casos presentaron delección en heterocigosis. En el

grupo **L-amp** y **N-amp**, 5 casos presentaron delección en heterocigosis en cada uno de los grupos.

Análisis del gen PAH

En el 22% de los casos el gen *PAH* presentó delección en heterocigosis: 4 del grupo **H-amp**, 5 en **L-amp** y 1 en **N-amp**.

Análisis del gen BCL2

En el gen se observó en el 17% de sus casos una delección en heterocigosis: 3 en el grupo **H-amp**, 4 en **L-amp** y 1 en **N-amp**.

Análisis del gen PARK2

El 13% de los casos presentó una delección en heterocigosis. Esta alteración solo estaba presente en los grupos con amplificación de *EGFR*, en el grupo **H-amp** en 5 casos y en el **L-amp** en un caso.

Análisis del gen BRCA2

En este gen la delección en heterocigosis también se presentó en el 13% de los casos. Dos casos en el grupo **H-amp**, un caso en el grupo **L-amp**, y tres casos en el grupo **N-amp**.

Análisis del gen CD27

Se observó delección heterocigótica en el 13% de los casos: 3 en el grupo **H-amp**, 1 en el grupo **L-amp** y 2 en **N-amp**.

Análisis del gen MLH3

Este gen presentó delección en heterocigosis en el 11% de los casos. Solo en los grupos **H-amp** y **L-amp** se identificó la alteración, tres casos en el primero y dos casos en el segundo.

Los porcentajes de alteraciones de los genes referencia de este kit en los tres grupos de amplificación de *EGFR* se detallan en la tabla 32.

Tabla 25. VNC en los genes del kit MLPA probemix P105-D1 Glioma-2.

Casos	<i>PTEN</i>	<i>MDM2</i>	<i>CDK4</i>	<i>TP53</i>	<i>NFKBIA</i>	<i>MIR26A2</i>	<i>PDGFRA</i>
1							
2	LOH-p					LOH	
3		HMZ-p	LOH/HMZ	HMZ-p			
4	HMZ						
5	LOH-p	LOH-p	LOH-p				
6	LOH-p						
7							
8	LOH-p						
9		AMP	AMP				
10	LOH-p						
11	LOH						
12		LOH-p		LOH	LOH		
13							
14		LOH-p	LOH-p	LOH			
15		LOH-p		LOH			
16							
17							
18							
19	LOH-p	AMP					
20	HMZ			LOH	LOH		
21							
22		LOH-p	LOH-p	LOH-p			
23	LOH-p						
24	LOH						
25							
26				LOH			
27	HMZ						
28							
29	LOH						
30	LOH				LOH		
31	LOH						
32	HMZ						
33		LOH	LOH-p			LOH	
34		LOH	LOH-p	LOH-p			
35				LOH	LOH		
36		LOH		LOH	LOH		
37	LOH-p			HMZ-p			
38							
39				LOH			
40							
41							
42		LOH-p		LOH	LOH		
43	LOH						
44							
45							
46							

AMP. Amplificación. **HMZ.** Deleción en homocigosis; **HMZ-p.** Deleción en homocigosis parcial. **LOH.** Deleción en heterocigosis; **LOH-p.** Deleción en heterocigosis parcial.

Tabla 26. VNC de los genes de referencia del kit MLPA probemix P105-D1 Glioma-2.

Casos	c - OCA2	c - SAMHD1	c - MYBPC3	c - LARGE
1			LOH	
2				LOH
3	LOH	LOH	LOH	
4				LOH
5	LOH	LOH	LOH	LOH
6				LOH
7				
8	LOH			LOH
9				
10				LOH
11			LOH	
12	LOH	LOH	LOH	
13				LOH
14	LOH	LOH	LOH	LOH
15	LOH	LOH	LOH	LOH
16				LOH
17				
18			LOH	
19				
20		LOH	LOH	LOH
21				
22	LOH	LOH	LOH	
23	LOH			
24				LOH
25				
26		LOH	LOH	
27		LOH		
28				
29		LOH		LOH
30				LOH
31				
32				
33				
34		LOH		
35		LOH		
36				
37		LOH	LOH	LOH
38		LOH		
39				
40				
41				
42			LOH	
43			LOH	
44				
45				
46			LOH	

Tabla 27. VCN en los genes del kit ME001-C2 Tumor suppressor -1.

Casos	CDKN2A	CDKN2B	VHL	GSTP1	CASP8	FHIT	APC	CDH13	TIMP3	BRCA1
1										
2										
3	LOH		HMZ	LOH	LOH		LOH			LOH
4	HMZ	HMZ							LOH	
5	HMZ	HMZ	LOH	LOH						LOH
6	HMZ	HMZ							LOH	
8	HMZ	HMZ	LOH							
9										
10	LOH	LOH				LOH		LOH		
11	HMZ	HMZ								
12	HMZ	HMZ		LOH	LOH	LOH	LOH			
13	LOH	LOH								
14	LOH	LOH	LOH	LOH						
15	HMZ	HMZ	LOH	LOH						
16	LOH	LOH	LOH							
17										
18	LOH	LOH								
19	HMZ	HMZ								
20	HMZ	HMZ	LOH	LOH						
21			LOH			LOH				
22										
23					LOH		LOH	LOH		
24	HMZ	HMZ								LOH
25	LOH	LOH						LOH		
26										
27	HMZ	HMZ	LOH	LOH						
28			LOH	LOH		LOH				
29			LOH	LOH						
30	HMZ	HMZ						LOH		
31	LOH	LOH								
32	LOH	LOH								
33							LOH			
34			LOH	LOH	LOH			LOH		
35										
36				LOH		LOH				
37				LOH						
38	LOH	LOH								
39										
40										
42	HMZ	LOH	LOH	LOH						
43				LOH						
44										
45	HMZ	HMZ	LOH						LOH	
46			LOH							

Tabla 28. VNC en los genes referencia del kit ME001-C2 Tumor suppressor-1.

Casos	CREM	CDH1	PAH	BCL2	PARK2	BRCA2	CD27	MLH3
1								
2	LOH							
3	HMZ	LOH	LOH					LOH
4	LOH					LOH		LOH
5	LOH		LOH					
6								
8		LOH						
9							LOH	
10	LOH		LOH	LOH	LOH			
11	LOH							
12	LOH		LOH	LOH				
13						LOH		LOH
14				LOH				
15		LOH					LOH	
16		LOH				LOH		
17					LOH			
18		LOH			LOH			
19					LOH			
20		LOH					LOH	
21			LOH	LOH				
22	LOH	LOH	LOH	LOH				LOH
23			LOH					
24	LOH	LOH			LOH		LOH	LOH
25	LOH		LOH	LOH				
26								
27		LOH						
28	LOH		LOH	LOH				
29		LOH				LOH		
30		LOH						
31	LOH							
32						LOH		
33						LOH		
34	LOH	LOH	LOH	LOH				
35							LOH	
36								
37	LOH					LOH		
38		LOH						
39		LOH						
40								
42	LOH	LOH					LOH	
43								
44								
45								
46		LOH						

Tabla 29. Porcentajes de alteraciones de los distintos genes del kit MLPA probemix P105-D1 Glioma-2, en los tres grupos de amplificación de *EGFR*.

Grupos	<i>PTEN</i>	<i>MDM2</i>	<i>CDK4</i>	<i>TP53</i>	<i>NFKBIA</i>	<i>MIR26A2</i>
H-amp	45%	35%	20%	25%	15%	0%
L-amp	50%	10%	10%	20%	10%	0%
N-amp	25%	25%	10%	38%	19%	6%

Tabla 30. Porcentaje de alteraciones de los genes de referencia del kit MLPA probemix P105-D1 Glioma-2, en los tres grupos de amplificación de *EGFR*.

Grupos	<i>OCA2</i>	<i>SAMHD1</i>	<i>MYBPC3</i>	<i>LARGE</i>
H-amp	30%	30%	45%	55%
L-amp	20%	40%	20%	30%
N-amp	0%	25%	25%	6%

Tabla 31. Porcentaje de alteraciones de los genes del kit ME001-C2 Tumor suppressor-1, en los tres grupos de amplificación de *EGFR*.

Grupos	<i>CDKN2A</i>	<i>CDKN2B</i>	<i>VHL</i>	<i>GSTP1</i>	<i>CASP8</i>	<i>FHIT</i>	<i>APC</i>	<i>CDH13</i>	<i>TIMP3</i>	<i>BRCA1</i>
H-amp	79%	74%	37%	32%	10%	10%	10%	5%	10%	10%
L-amp	40%	40%	40%	30%	10%	20%	10%	30%	10%	0%
N-amp	33%	33%	27%	33%	6%	6%	6%	6%	6%	0%

Tabla 32. Porcentajes de alteraciones de los genes de referencia del kit ME001-C2 Tumor suppressor-1, en los tres grupos de amplificación de *EGFR*.

Grupos	<i>CREM</i>	<i>CDH1</i>	<i>PAH</i>	<i>BCL2</i>	<i>PARK2</i>	<i>BRCA2</i>	<i>CD27</i>	<i>MLH3</i>
H-amp	37%	32%	21%	15%	26%	10%	15%	15%
L-amp	40%	50%	50%	40%	10%	10%	10%	20%
N-amp	27%	33%	6%	6%	0%	20%	13%	0%

Perfiles genéticos en los tres grupos según el estatus de EGFR, obtenidos con el análisis de la MLPA

Realizando una visión general del estudio de genes estudiados sobre la variación en el número de copias por MLPA, y si consideramos aquellos genes que aparecen alterados en el 40% o más de los casos en cada uno de los grupos establecidos, se observó que existen diferentes genes implicados en los grupos con diferentes niveles de amplificación, mientras que en el grupo de casos sin amplificación de *EGFR*, ningún gen se alteró en este porcentaje. Además, en los dos grupos con amplificación de este gen, los genes *PTEN* y *CDKN2A/2B* aparecieron implicados en ambos grupos (Tabla 33).

Si también consideramos aquellos genes que aparecen alterados en el 30% o más de los casos en cada uno de los grupos, observamos la existencia de un perfil genético muy similar en los dos grupos con amplificación: el H-amp y el L-amp. Estos dos grupos presentan un patrón distinto con respecto al grupo de casos sin amplificación de *EGFR*, en el cual solo aparecen cuatro genes implicados, aunque hay que resaltar que de ellos, tres genes los comparte con los dos grupos con amplificación de este gen, y el gen *TP53* esta incluido solo en este grupo (Tabla 34).

Los porcentajes del 30% y 40% se escogieron por ser los que se presentan más significativos en los genes de aparición más frecuente en el GB.

Tabla 33. Genes implicados en el 40% o más de los casos en los tres grupos según el estatus del *EGFR*. (En negrita los genes comunes).

H-amp	L-amp	N-amp
<i>PTEN</i>	<i>PTEN</i>	---
<i>CDKN2A/2B</i>	<i>CDKN2A/2B</i>	---
<i>MYBPC3</i>	<i>SAMHD1</i>	
<i>LARGE</i>	<i>VHL</i>	
	<i>CREM</i>	
	<i>CDH1</i>	
	<i>PAH</i>	
	<i>BCL2</i>	

Tabla 34. Genes implicados en el 30% o más de los casos en los tres grupos según el estatus del *EGFR*. (En negrita los genes comunes).

H-amp	L-amp	N-amp
<i>PTEN</i>	<i>PTEN</i>	---
<i>CDKN2A/2B</i>	<i>CDKN2A/2B</i>	<i>CDKN2A/2B</i>
<i>GSTP1</i>	<i>GSTP1</i>	<i>GSTP1</i>
<i>CDH1</i>	<i>CDH1</i>	<i>CDH1</i>
<i>SAMHD1</i>	<i>SAMHD1</i>	
<i>VHL</i>	<i>VHL</i>	
<i>CREM</i>	<i>CREM</i>	
<i>LARGE</i>	<i>LARGE</i>	
<i>MDM2</i>	<i>PAH</i>	<i>TP53</i>
<i>MYBPC3</i>	<i>BCL2</i>	
<i>OCA2</i>		

Resultados del análisis estadístico: a pesar que el número de casos no es elevado para poder desarrollar el análisis estadístico con las garantías necesarias, se analizaron los p-valores proporcionados por el test Chi-cuadrado de homogeneidad de proporciones de los genes estadísticamente significativos al nivel de significación habitual ($p = 0.05$). Entre los tres grupos según el estatus de amplificación de *EGFR* los genes estadísticamente significativos han sido los siguientes: *CDKN2A* ($p = 0.017$), *CDKN2B* ($p = 0.044$), *PAH* ($p = 0.039$), y *LARGE* ($p=0.008$) (Apéndice II, Tabla 3 y 4).

Del análisis de la variable supervivencia, con respecto a los parámetros genéticos estudiados, se observó que la frecuencia de alteraciones en *MDM2* era mayor en el grupo con una evolución menor de 14 meses que el grupo con una evolución superior a 14 meses. Este hecho fue estadísticamente significativo, con $p=0,033$ según el test Chi-cuadrado.

Aunque otros genes no fueron significativos a nivel estadístico cabe destacar, que muchos de ellos presentaron una frecuencia relativa de alteraciones, mayor en el grupo de menor evolución. Por ejemplo, *EGFR* tuvo una frecuencia relativa de alteraciones mayor en el grupo de evolución menor de 14 meses (46%) con respecto al grupo de evolución superior de 14 meses (28,9%); y el gen *TP53* presentó en el grupo de evolución menor de

14 meses una frecuencia mayor de alteraciones (19,4%) con respecto al grupo de evolución superior de 14 meses (1,7%).

Genes estudiados con MLPA implicados en vías de señalización dependientes de EGFR

Cuando realizamos el análisis de las alteraciones génicas en relación con la vía afectada en cada tumor se observa que con una alteración génica como mínimo, los resultados son los siguientes:

La vía 1 (EGFR/RAS/NF1/PTEN/PI3K) aparece alterada en 34 tumores, lo que representa el 74% del total de los casos. Esta vía muestra una alteración en el 100% de los casos del grupo H-amp (20/20), igualmente en el 100% del grupo L-amp (10/10), y solo se observa en el 15% del grupo N-amp (4/16) (Tabla 35).

La vía 2 (TP53/MDM2/MDM4/p16^{ARF}) aparece alterada en 17 tumores, representando el 37% de los casos. Se observó una alteración en el 40% de los casos del grupo H-amp (8/20), en el 20% del grupo L-amp (2/10), y en el 44% de los casos del grupo N-amp (7/16) (Tabla 35).

La vía 3 (p16^{INK4a}/CDK4/RB1) aparece alterada en 28 tumores, representando el 61% de los casos. Se observó una alteración en el 80% de los casos del grupo H-amp (16/20), en el 50% del grupo L-amp (5/10), y en el 44% de los casos del grupo N-amp (7/16) (Tabla 35).

Tabla 35. Porcentaje de casos con un gen alterado en los tres grupos de EGFR en las tres vías de señalización

Grupos	Via 1		Via 2		Via 3	
H-amp	100%	20/20	40%	8/20	80%	16/20
L-amp	100%	10/10	20%	2/10	50%	5/10
N-amp	25%	4/16	44%	7/16	44%	7/16
Total	74%	34/64	37%	17/46	61%	28/46

Cuando realizamos el análisis teniendo en cuenta los casos que simultáneamente tienen alterados los dos genes analizados en las distintas vías, los resultados son los siguientes:

La vía 1 (EGFR/RAS/NF1/PTEN/PI3K) aparece alterada en 14 tumores, lo que representa el 30% del total de los casos. Esta vía muestra una alteración en el 45% de los casos del grupo H-amp (9/20), en el 50% del grupo L-amp (5/10), y en ningún caso del grupo N-amp (0/16) (Tabla 36).

La vía 2 (TP53/MDM2/MDM4/p16^{ARF}) aparece alterada en 8 tumores, representando el 17% de los casos. Se observó una alteración en el 20% de los casos del grupo H-amp (8/20), en el 10% del grupo L-amp (1/10), y en el 19% de los casos del grupo N-amp (3/16) (Tabla 36).

La vía 3 (p16^{INK4a}/CDK4/RB1) aparece alterada en 3 tumores, representando el 7% de los casos. Se observó una alteración en el 15% de los casos del grupo H-amp (3/20), y ningún caso alterado en los otros dos grupos (Tabla 36).

Tabla 36. Porcentaje de casos en los tres grupos de *EGFR* con dos genes alterados en las tres vías de señalización

Grupos	Via 1		Via 2		Via 3	
H-amp	45%	9/20	20%	4/20	15%	3/20
L-amp	50%	5/10	10%	1/10	0%	0/10
N-amp	0%	0/16	19%	3/16	0%	0/16
Total	30%	14/46	17%	8/46	7%	3/46

Haciendo un análisis de la acumulación de alteraciones en los diferentes grupos se obtiene: En el grupo H-amp, el 30% de los casos tienen alteradas las tres vías de señalización, en el grupo L-amp el 10%, y en el grupo N-amp ningún caso acumuló alteraciones en las tres vías simultáneamente.

4.3.2.2 Estudio del estatus de metilación con el kit ME001-C2 Tumor suppressor -1

La metilación fue estudiada en cada uno de los 24 genes supresores de tumores del kit ME001-C2 Tumor suppressor-1. De ellos se identificó hipermetilación en los genes *RASSF1*, *CASP8*, *ESR1*, *CDKN2B*, *FHIT*, *CDH13*, *TP73* y *VHL* (Tabla 38). En este estudio no se incluyó el caso 33 por falta de material.

Análisis del gen *RASSF1*

Hipermetilación en el gen *RASSF1* se detectó en el 67% de los casos estudiados. En el grupo H-amp 14 casos presentaron esta alteración, 7 casos en el grupo L-amp y 10 casos en el grupo N-amp.

Análisis del gen *CASP8*

El gen *CASP8* presentó hipermetilación en el 20% de los casos. En el grupo H-amp solo un caso estaba hipermetilado; en el grupo L-amp cuatro casos; y en el grupo N-amp cuatro casos.

Análisis del gen *ESR1*

Se detectó hipermetilación del gen *ESR1* en el 13% de los casos. En el grupo H-amp en tres casos, un caso en el grupo L-amp y dos casos en el grupo N-amp.

Análisis del gen *CDKN2B*

La hipermetilación de este gen se observó en el 4% de los casos. Se detectó en un caso del grupo L-amp y en un caso del grupo N-amp.

Análisis del gen *FHIT*, *CDH13*, *TP73* y *VHL*.

La hipermetilación en estos genes se detectó solo en el 2% de los casos. En los genes *FHIT* y *CDH13* se detectó un caso de cada gen en el grupo H-amp. En el gen *TP73* se identificó hipermetilación en un caso del grupo L-amp. En el gen *VHL* solo se identificó una hipermetilación en un caso del grupo N-amp.

Del conjunto de genes estudiados en su estatus de metilación, el gen más hipermetilado fue el gen *RASSF1*. En los grupos L-amp y N-amp se observó el gen *CASP8* como el gen más metilado tras *RASSF1*, estando más hipermetilado en el grupo L-amp.

Los porcentajes de metilación de los genes supresores en los tres grupos de amplificación de *EGFR* se detallan en la tabla 37.

Tabla 37. Estado de metilación (hipermetilación en porcentajes) en genes supresores de tumores del kit ME001-C2 Tumor suppressor-1, en los tres grupos de amplificación de *EGFR*.

Grupos	<i>RASSF1</i>	<i>CASP8</i>	<i>ESR1</i>	<i>CDKN2B</i>	<i>FHIT</i>	<i>CDH13</i>	<i>TP73</i>	<i>UHL</i>
H-amp	70%	5%	15%	0%	5%	5%	0%	0%
L-amp	70%	40%	10%	10%	0%	0%	10%	0%
N-amp	62%	25%	13%	6%	0%	0%	0%	6%

Tabla 38. Hipermetilación de genes supresores del kit ME001-C2 Tumor suppressor-1. **M:** Hipermetilado.

Casos	<i>RASSF1</i>	<i>CASP8</i>	<i>ESR1</i>	<i>CDKN2B</i>	<i>FHIT</i>	<i>CDH13</i>	<i>TP73</i>	<i>VHL</i>
1								
2	M							
3	M	M						
4	M		M		M			
5								
6	M							
8	M							
9								
10						M		
11	M							
12	M							
13	M							
14	M		M					
15	M							
16	M							
17								
18	M							
19	M		M					
20	M							
21	M							
22								
23	M			M				
24	M						M	
25		M						
26	M	M						
27	M		M					
28	M	M						
29	M							
30		M						
31	M		M					
32	M							
34	M	M						
35	M							
36				M				
37	M	M						
38	M							
39								
40	M	M						
42	M		M					M
43	M							
44		M						
45								
46	M							

4.3.3 Estudios de secuenciación de *IDH1/IDH2* y *TP53*

IDH1/IDH2

Se estudiaron las mutaciones en las regiones genómicas que abarcan la región R132 de *IDH1* y la región R172 de *IDH2*. No se detectaron mutaciones en los 46 casos estudiados. Con este resultado se determinó que todos nuestros casos se clasificaban como Glioblastomas IDH no mutado según la clasificación reciente de la OMS ¹⁹¹.

TP53

Se estudiaron las mutaciones en los exones 5, 6,7 y 8 del gen *TP53* en los 46 casos de GB. Se encontraron 2 casos con mutación (4% de los casos). En el caso 29 que pertenece al grupo L-amp se encontró una mutación en heterocigosis p.C141R de tipo sustitución–missense en el exón 5 de *TP53*. En el caso 33 que forma parte del grupo N-amp se detectó una mutación en heterocigosis p.R273C de tipo sustitución–missense en el exón 8 de este gen (Figura 26).

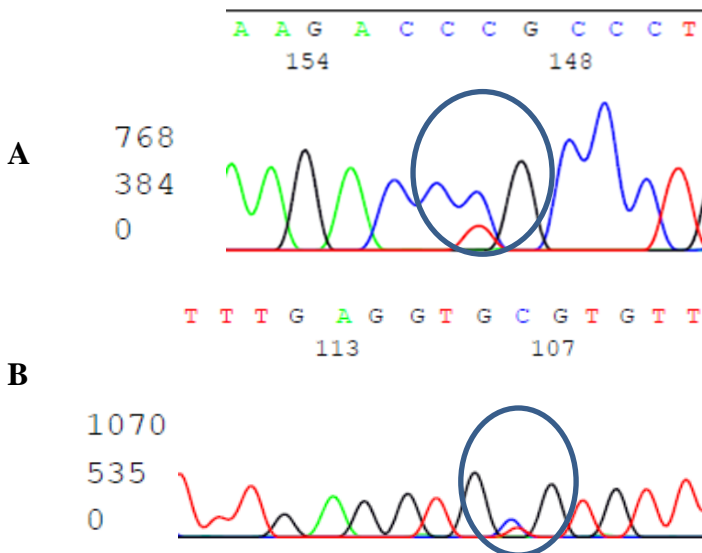


Figura 26. Secuenciación de *TP53*. A) Mutación en heterocigosis p.C141R exón 5, caso 29. B) Mutación heterocigosis p.R273C exón 8, caso 33.

4.4 Estudio de la expresión de miRNAs

La expresión de miRNAs mediante microarrays permitió el estudio de 6703 secuencias de miRNA en 30 casos de los 46 presentados en este trabajo.

Se interpretaron los resultados usando un análisis estadísticamente restrictivo Partek Genomis Suite v 6.6 y fueron detectados 102 miRNAs (Apéndice III), de ellos un total de 64 miRNAs resultaron ser significativos en el análisis de varianza con un valor $p \leq 0,05$ al realizar la comparación entre los grupos N-amp y H-Amp (tabla 39).

Por otra parte, se realizó una agrupación jerárquica sin supervisión de los 30 casos con los 102 miRNAs, que derivó del estudio comparativo de los grupos H-amp y N-amp, y se analizó la expresión del grupo L-amp con respecto a los otros grupos. Así mismo, se interpretó el estudio de discriminación entre grupos usando *Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA)* del estudio conjunto de perfiles de miRNAs, obtenido usando Genechip miRNA Array, entre los casos del grupo H-amp y los del grupo N-amp, para visualizar el comportamiento del grupo L-amp con respecto al resto de los grupos (Figura 27 A y B).

En ambos análisis, la expresión de miRNAs fue diferente en los grupos H-amp y el grupo N-amp (tabla 39). El PLS-DA permitió visualizar que la expresión de los casos del grupo L-amp se encontraba solapado con los casos del grupo H-amp y del grupo N-amp; y otros casos de este grupo presentaban un comportamiento intermedio entre los grupos H-amp y N-amp (Figura 27B).

Haciendo una comparación entre los miRNAs más significativos mediante el test no parámetro Kruskal -Wallis con $p \leq 0.05$, resultaron significativos 64 miRNAs entre el grupo H-amp y el grupo N-amp. Los miRNAs significativos comunes fueron: miR-200c, miR-138, miR-891a, miR-129, miR-379, miR-124, miR-128, miR-382, miR-383, miR-219-2, y miR-571, cuya función se detalla en la tabla 40.

Estos miRNAs se encontraban infraexpresados en los tumores del grupo H-amp con respecto al grupo N-amp, con excepción del miR-571 que se estaba sobreexpresado. La función de estos miRNAs se detalla en la tabla 40.

Tabla 39. miRNAs expresados diferencialmente entre los grupos H-amp y N-amp ordenados por el valor de $p \leq 0,05$ de significación estadística. Los miRNAs en negrita son los comunes en el modelo PLS-DA.

H-amp vs N-amp	P-value	Fold Change	H-amp vs N-amp	P-value	Fold Change
Down-regulated			Up-regulated		
hsa-miR-193a-3p_st	1.15E-03	-2.05	hsa-miR-320b_st	4.33E-03	1.49
hsa-miR-892b_st	1.26E-03	-2.75	hsa-miR-320a_st	5.25E-03	1.48
hsa-miR-200c_st	2.37E-03	-3.84	hsa-miR-320d_st	5.25E-03	1.50
hsa-miR-34c-3p_st	2.41E-03	-1.91	hsa-miR-320c_st	6.35E-03	1.42
hsa-miR-138_st	2.91E-03	-3.47	hsa-miR-1228_st	1.09E-02	1.66
hsa-miR-299-5p_st	2.91E-03	-2.34	hsa-miR-548f_st	1.09E-02	1.27
hsa-miR-891a_st	3.55E-03	-6.89	hsa-miR-571_st	1.09E-02	1.22
hsa-miR-200a_st	7.65E-03	-1.84	hsa-miR-106a-star_st	1.31E-02	1.48
hsa-miR-363_st	7.66E-03	-1.60	hsa-miR-496_st	1.84E-02	1.27
hsa-miR-342-5p_st	9.19E-03	-1.36	hsa-miR-877_st	1.84E-02	1.44
hsa-miR-569_st	9.19E-03	-1.41	hsa-miR-1292_st	2.55E-02	1.29
hsa-miR-129-5p_st	1.09E-02	-2.99	hsa-miR-675_st	2.99E-02	1.42
hsa-miR-342-3p_st	1.09E-02	-1.37	hsa-miR-876-3p_st	2.99E-02	1.29
hsa-miR-379_st	1.09E-02	-3.56	hsa-miR-32_st	3.49E-02	1.27
hsa-miR-491-5p_st	1.09E-02	-2.03	hsa-miR-340_st	3.49E-02	1.17
hsa-miR-124_st	1.31E-02	-4.64	hsa-miR-340-star_st	4.07E-02	1.13
hsa-miR-128_st	1.31E-02	-2.54	hsa-miR-1273_st	4.71E-02	1.25
hsa-miR-193a-5p_st	1.31E-02	-2.05	hsa-miR-549_st	4.71E-02	1.12
hsa-miR-132_st	1.84E-02	-1.61	hsa-miR-570_st	4.71E-02	1.22
hsa-miR-134_st	1.84E-02	-2.46			
hsa-miR-148a-star_st	1.84E-02	-1.41			
hsa-miR-586_st	1.84E-02	-1.28			
hsa-miR-409-3p_st	2.21E-02	-1.99			
hsa-miR-124-star_st	2.25E-02	-1.79			
hsa-miR-203_st	2.25E-02	-1.71			
hsa-miR-507_st	2.25E-02	-1.21			
hsa-miR-890_st	2.25E-02	-1.38			
hsa-miR-10a-star_st	2.99E-02	-1.41			
hsa-miR-129-3p_st	2.99E-02	-1.52			
hsa-miR-139-5p_st	2.99E-02	-2.38			
hsa-miR-217_st	2.99E-02	-2.78			
hsa-miR-377-star_st	2.99E-02	-1.72			
hsa-miR-127-3p_st	3.49E-02	-2.44			
hsa-miR-382_st	3.49E-02	-2.66			
hsa-miR-523-star_st	3.49E-02	-1.22			
hsa-miR-654-3p_st	3.49E-02	-1.83			
hsa-miR-375_st	4.07E-02	-1.41			
hsa-miR-383_st	4.07E-02	-3.47			
hsa-miR-886-3p_st	4.07E-02	-2.07			
hsa-miR-1262_st	4.71E-02	-1.26			
hsa-miR-219-2-3p_st	4.71E-02	-3.09			
hsa-miR-367_st	4.71E-02	-1.18			
hsa-miR-485-3p_st	4.71E-02	-1.97			
hsa-miR-517b_st	4.71E-02	-1.18			
hsa-miR-590-3p_st	4.71E-02	-1.14			

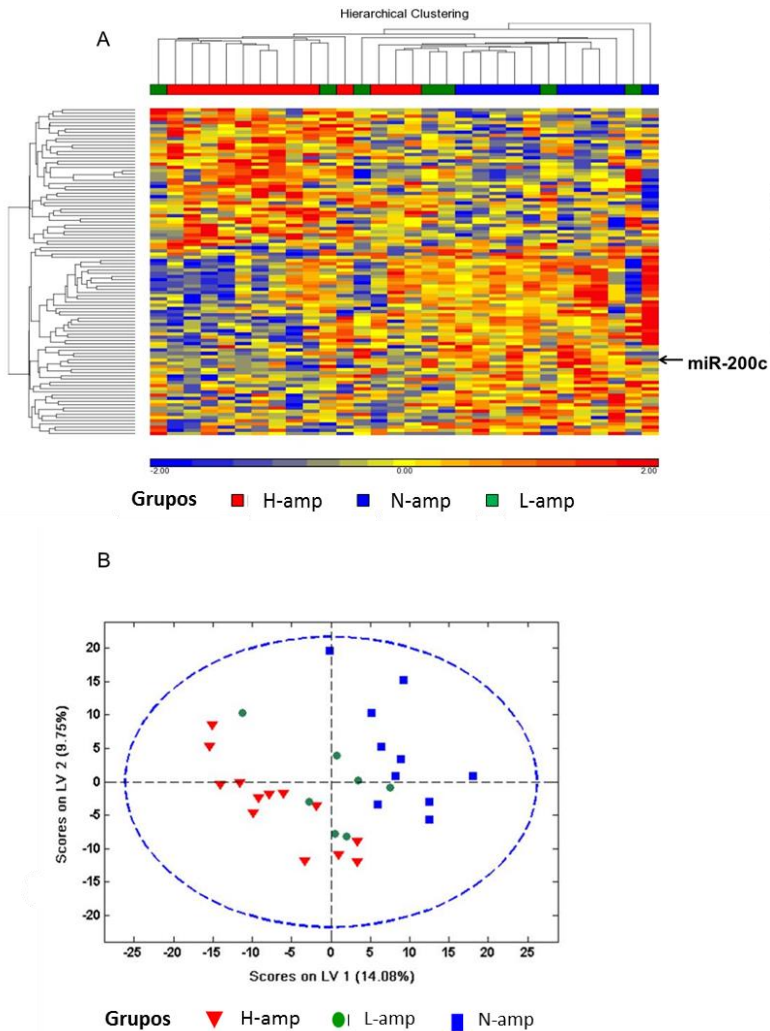


Figura 27. Análisis de la expresión de miRNAs mediante microarrays en 30 GBs. **A)** Agrupación jerárquica sin supervisión de 30 casos de GB con 102 miRNAs, a la izquierda una agrupación de los casos del grupo H-amp, y a la derecha una agrupación de los casos del grupo N-amp. Los casos correspondientes al grupo L-amp se localizaron de manera variable entre ambos grupos. **B)** PLS-DA del estudio conjunto de perfiles de miRNAs entre los casos del grupo H-amp (triángulo rojo) y los del grupo N-amp (cuadrado azul), para visualizar el comportamiento del grupo L-amp (círculo verde) con respecto al resto de grupo.

Tabla 40. Función de los miRNAs significativos comunes a los grupos de estudio.

miRNA	Función
miR-200c	Implicado en procesos de migración celular, via PI3K/AKT, proceso de EMT (Regula <i>ZEB1/2</i>).
miR-138	Regula la angiogénesis, proliferación celular, apoptosis e hipoxia (<i>HIF1</i>).
miR-891a	Promotor de la proliferacion celular, la migración y la invasión.
miR-129-5p	Regulación del ciclo celular, proliferación, proceso de EMT.
miR-379	Regulación del ciclo celular, regulando ciclina B1.
miR-124	Su sobreexpresión aumenta la diferenciación neural y disminuye la migración e invasión.
miR-128	Su sobreexpresión inhibe <i>HIF1a</i> y <i>VEGF</i> , disminuye la proliferación celular, crecimiento tumoral y angiogénesis.
miR-382	Interviene en la migración celular, invasión, proceso de EMT, y en la via de señalización <i>PTEN/AKT</i> .
miR-383	La transfección de miR-383 disminuye la viabilidad, la invasión, migración y aumenta la apoptosis.
miR219	Su sobreexpresión bloquea la proliferación celular, migración e invasión. Reduce la via <i>ERK1/2</i> relacionada con la migración invasión y metastasis.
miR-571	Es un mediador en procesos inflamatorios en diferentes compartimentos celulares

Al comparar las intensidades absolutas de estos miRNAs más significativos, se observó que el perfil de expresión del miR-200c presentó una diferencia de intensidad de expresión (media:2,5) que permitió diferenciar el grupo H-amp, frente a los otros dos grupos L-amp (media: 5) y N-amp (media: 5,2), aunque no permitió diferenciar entre estos dos últimos (Tabla 41).

Tabla 41. Cuadro comparativo de intensidades absolutas de los perfiles de expresión de los miRNAs significativos en los casos de GB. Rojo: grupo H-amp; Verde: grupo L-amp; Azul: grupo N-amp.



Casos/miRNAs	miR-200c	miR-138	miR-891a	miR-129	miR-379	miR-124	miR-128	miR-383	miR-382	miR-219	miR-571
2	2,08	9,68	3,94	5,08	7,53	11,02	7,07	5,04	3,27	5,89	0,70
3	3,03	5,05	2,61	2,18	6,02	6,18	5,87	1,03	7,75	7,67	0,71
4	2,59	7,81	5,46	0,50	4,22	4,42	5,66	0,70	6,63	7,87	0,46
5	2,02	8,10	3,79	0,40	4,38	7,57	4,72	1,55	3,37	5,62	0,91
6	3,14	9,23	4,05	2,99	7,02	4,97	6,04	1,25	7,75	2,58	0,55
8	2,15	7,46	0,95	1,91	3,88	7,62	4,35	4,89	1,21	5,96	1,01
9	2,08	5,94	6,60	2,25	8,02	8,86	6,80	5,87	6,36	6,94	0,83
10	3,42	5,59	2,73	0,35	3,06	8,08	5,99	0,55	6,34	9,19	0,69
11	3,32	7,74	3,84	1,50	2,26	7,39	6,40	3,01	7,18	7,67	1,52
12	2,79	8,23	1,40	3,41	5,70	10,58	7,70	3,99	7,22	5,83	0,49
14	3,24	8,03	2,13	3,14	6,83	10,22	6,79	3,74	5,80	4,25	0,59
15	1,95	7,04	4,95	1,20	6,15	6,75	5,68	1,10	5,23	1,26	0,30
16	2,50	7,34	3,06	1,09	4,88	5,40	2,89	1,85	3,17	6,41	1,21
20	2,69	6,08	2,20	3,57	1,14	12,18	6,60	6,79	6,89	9,33	0,74
22	4,68	7,26	8,07	2,61	4,29	8,67	6,37	5,02	7,11	6,86	0,58
23	4,07	11,04	5,96	3,54	6,95	10,80	6,87	4,16	5,52	5,08	0,27
24	4,38	8,52	3,61	1,34	2,09	7,90	4,72	0,85	6,25	7,29	1,46
25	5,99	9,08	6,55	1,97	7,29	7,13	7,15	5,22	2,02	2,00	0,87
27	4,58	6,74	4,85	3,02	7,42	10,31	5,36	2,03	7,29	6,14	0,71
29	6,45	8,79	5,20	2,47	7,05	7,21	6,59	1,35	6,84	7,39	0,33
31	4,21	9,62	7,57	1,68	7,01	9,35	6,07	6,49	3,80	2,18	0,41
32	4,13	9,40	6,38	2,84	6,13	8,39	7,27	3,47	6,99	6,39	0,23
35	4,83	10,05	6,36	3,21	6,43	8,13	6,66	4,61	5,86	5,52	0,46
36	4,56	7,77	4,43	4,40	6,74	10,95	7,61	2,60	6,15	7,80	0,38
37	8,33	9,45	7,10	2,72	7,84	8,75	6,32	2,42	5,71	7,35	0,28
38	4,11	9,68	5,81	3,82	7,17	10,94	7,46	4,91	6,64	10,53	0,46
39	5,98	8,30	8,37	4,05	6,86	10,25	7,03	4,58	4,86	6,33	0,46
40	5,57	9,32	9,25	3,00	7,59	9,00	6,55	5,22	5,74	8,23	0,88
41	5,98	11,24	2,47	6,09	8,58	12,49	9,84	7,36	6,83	3,72	0,43
42	4,51	7,93	5,12	4,00	7,79	10,11	7,03	2,88	6,70	1,97	0,75

4.4.1 Estudio del miR-200c y la expresión de mRNA de CDH1 y ZEB1 en relación a la amplificación de *EGFR*

Del estudio de miRNAs hemos elegido el miR-200c por tener la mas alta significancia discriminadora ($p = 2,37E^{-3}$) entre el grupo de tumores con alta amplificación de *EGFR* y los otros dos grupos, y por ser un miRNA clave en la EMT, y por lo tanto en la infiltración tumoral. En la segunda parte de este trabajo expondremos los resultados del modelo experimental utilizado para el estudio del comportamiento del miR-200c. Vamos a abordar el estudio de la expresión del mRNA del miR-200c y la expresión de dos de sus genes dianas como son el CDH1 y el ZEB1.

Primeramente hemos comprobado una relación altamente significativa entre los niveles de amplificación del gen *EGFR* y su expresión.

La expresión de mRNA de *EGFR* fue cuantificado mediante qRT-PCR. Se observó que los tumores con un alto nivel de amplificación de *EGFR* mostraron un aumento de más de diez veces ($11,5 \pm 0,01$; $p = 6,0E^{-4}$) en la expresión de *EGFR* con respecto a los tumores sin amplificación de *EGFR*; mientras que los tumores con un bajo nivel de amplificación de *EGFR* mostraron un aumento de más de dos veces ($3,7 \pm 0,01$, $p = 0,03$) en la expresión de *EGFR* con respecto a los tumores sin amplificación de *EGFR* (Figura 28).

Análisis de la expresión de miR-200c

Realizamos una qRT-PCR para validar los 46 casos del estudio, cuantificando la expresión de miR-200c en los tres grupos de amplificación de *EGFR* (Figura 28). Hemos observado que las muestras del grupo H-amp tienen niveles estadísticamente más bajos ($0,4 \pm 0,03$, $p = 0,04$) de miR-200c que los otros grupos. Las muestras del grupo L-amp no muestran diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo N-amp, con una expresión intermedia ($0,6 \pm 0,03$) entre el grupo H-amp y N-amp.

Análisis de la expresión de CDH1 y ZEB1

Se analizaron los niveles de expresión de CDH1 y *ZEB1* por qRT-PCR. Los tumores del grupo H-amp y menor expresión de miR-200c

mostraron niveles de expresión CDH1 más bajos que el grupo L-amp y que el grupo N-amp. A su vez, los niveles de expresión de *CDH1* para el grupo H-amp y grupo L-amp mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($p=0,03$). Así mismo ambos mostraron diferencias con respecto al grupo N-amp ($4,4\pm0,21$, $p=0,04$ y $0,4\pm0,23$, $p=0,03$ respectivamente) (Figura 28).

Por el contrario, los niveles de expresión de mRNA de ZEB1 fueron significativamente menores en el grupo N-amp con respecto al grupo H-amp ($4,2\pm0,20$ $p=0,04$ y al grupo L-amp ($4,4\pm1,30$ $p=0,04$). Sin embargo, el grupo L-amp mostró niveles de expresión de ZEB1 comparables a los detectados en el grupo H-amp (Figura 28).

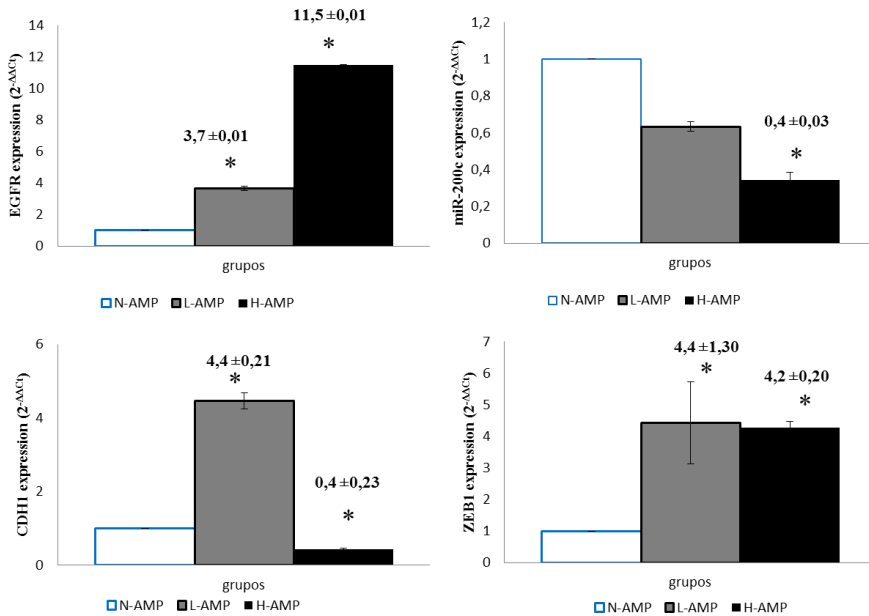


Figura 28. Análisis por qRT-PCR de la expresión de EGFR, miR-200c, CDH1 y ZEB1 en 30 GB.

4.4.2 Análisis de la expresión proteica de EGFR, CDH1, y ZEB1

Utilizando la técnica de western blot se han analizado las proteínas codificadas por EGFR y CDH1, y mediante inmunohistoquímica la proteína ZEB1. Se seleccionaron los casos donde se obtuvieron las mejores concentraciones de proteína, y se escogieron 10 casos de cada uno de los grupos en función del estatus del *EGFR*.

La expresión de la proteína **EGFR** fue detectada en todos los casos del grupo H-amp. Los valores de expresión estaban en un rango de 0,10-1,41 de intensidad de expresión con una media de expresión de 0,73. En los casos del grupo L-amp se detectó en solo dos casos expresión de la proteína (0,12-0,2). En los casos del grupo N-amp no se detectó expresión de la proteína mediante esta técnica (Figura 29).

Hemos detectado mediante western blot la presencia de la proteína truncada EGFR, la variante EGFRvIII, en seis de los diez casos estudiados (casos 2, 4, 8, 14, 15, 16). Esta proteína se detecta a un peso molecular de 140 kDa con respecto al peso de la proteína normal de 175kDa.

La expresión de la proteína **E-caderina**, en el grupo H-amp, se detectó solo, en 2 casos con 0,40 y 0,42 píxeles; en los grupo L-amp y N-amp se detectó en casi todos los casos la expresión de esta proteína con valores entre 0,07-0,47 píxeles, siendo superior la expresión en N-amp frente a los demás grupos (Tabla 42, y figura 29).

La expresión inmunohistoquímica de **ZEB1** fue homogénea con un valor de 3 en el 100% de los casos del grupo H-amp, y también en el 70% de los casos de grupo L-amp. En el grupo N-amp solo el 40% se valoró como 3, los casos restantes presentaron en el mismo número de casos nivel 1 y 2 de expresión de ZEB1 (Tabla 42).

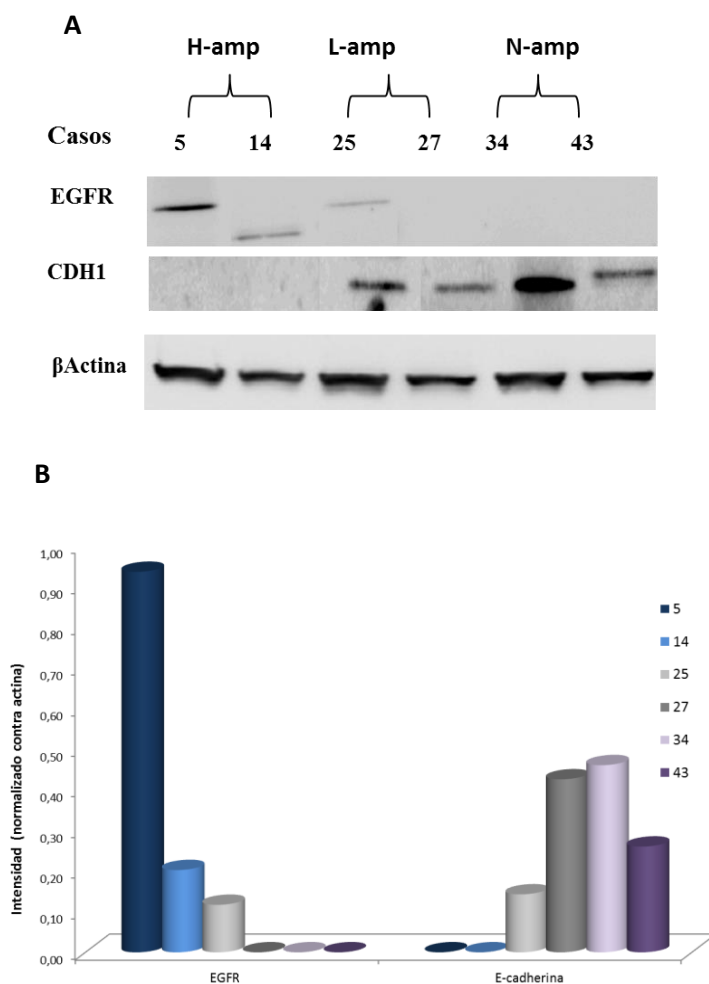


Figura 29. Expresión de las proteínas EGFR y E-caderina (*CDH1*) en casos que pertenecen a los tres grupos de estudio. A). Imagen de las bandas de Western blot. **B).** Cuantificación de la expresión de las proteínas E-caderina y EGFR, en los casos 5 y 14 (H-amp), casos 25 y 27 (L-amp), y casos 34 y 43 (N-amp).

Tabla 42. Cuantificación de la expresión por western blot para EGFR y CDH1 (izquierda) y expresión inmunohistoquímica de la proteína ZEB1 (derecha). El asterisco indica la presencia de la proteína truncada de EGFR. Color rojo: H-amp; Verde: L-amp; Azul: N-amp

casos	EGFR	CDH1	casos	ZEB1
2	1,14*	0,00	2	3
4	1,41*	0,42	4	3
5	0,94	0,00	5	3
8	1,23*	0,00	8	3
12	0,10	0,00	12	3
13	0,74	0,40	13	3
14	0,20*	0,00	14	3
15	0,24*	0,00	15	3
16	0,28*	0,00	16	3
19	1,05	0,00	19	3
21	0,09	0,23	21	3
22	0,00	0,00	22	3
23	0,00	0,28	23	1
24	0,00	0,33	24	3
25	0,12	0,14	25	3
26	0,00	0,00	26	1
27	0,00	0,43	27	3
28	0,00	0,39	28	3
29	0,20	0,07	29	1
30	0,00	0,24	30	3
32	0,00	1,2	32	3
33	0,00	0,21	33	1
34	0,00	0,46	34	3
35	0,00	0,57	35	2
36	0,00	1,40	36	3
38	0,00	1,38	38	1
40	0,00	0,11	40	3
43	0,00	0,26	43	2
44	0,00	0,21	44	2
45	0,00	1,19	44	2
46	0,00	0,23	46	1

4.5 Modelo experimental: Generación de cultivos celulares para el estudio del comportamiento del miR-200c

En esta parte de la tesis vamos a exponer los resultados del comportamiento del miR-200c en cultivos celulares. Este miRNA ha sido elegido por ser discriminatorio entre los tres grupos de glioblastomas, establecidos según el nivel de amplificación de *EGFR*, y estar implicado en procesos de migración celular.

Según nuestro protocolo de trabajo en el laboratorio de cultivos celulares, se incluyeron en cultivo los 46 tumores primarios de glioblastoma. Para este estudio se eligieron seis cultivos primarios que consiguieron adaptarse “*in vitro*” durante al menos cinco pases. Además se escogieron con los diferentes niveles de amplificación de *EGFR* descritos.

Los cultivos se identificaron indicando las letras HC y el número correspondiente. Los cultivos primarios fueron: HC-439, HC-444, HC-466, HC-468, HC-534 y HC-634. También fueron incluidas dos líneas celulares establecidas: U87 y U118 (ATCC).

Los cultivos se obtuvieron de los casos de tumores primarios que se indican en la tabla 43.

Tabla 43. Identificación del cultivo celular correspondiente al tumor primario del que proceden.

Cultivos	Caso
HC-439	24
HC-444	34
HC-466	6
HC-468	35
HC-534	28
HC-634	43

Los 8 cultivos celulares se pusieron en cultivo *in vitro* con el objetivo de estudiarlos, caracterizarlos y obtener material suficiente para el presente estudio y posteriores, pasando a formar parte de la colección de cultivos de nuestro grupo de investigación que se crioconservan en nitrógeno líquido.

Los cultivos celulares obtenidos crecieron en monocapa. Se adhirieron a la superficie del frasco entre las 24 y 48 primeras horas tras la siembra. Y cuando alcanzaron la confluencia se realizaron los doblajes.

Debido al potencial y rapidez de crecimiento del cultivo HC-444 se procedió a realizar subcultivos y se consiguió establecer una línea celular (No incluida en este estudio).

4.5.1 Caracterización de los cultivos celulares

Sobre los cultivos seleccionados se realizó una caracterización de los mismos estableciendo los patrones morfológicos y genéticos.

4.5.1.1 Caracterización morfológica

El estudio morfológico de los cultivos celulares se realizó con el microscopio de contraste de fases. Las células cultivadas crecieron en monocapa, mostrando patrones de crecimiento variable y una morfología celular heterogénea. Los cultivos seleccionados mostraron un crecimiento rápido, con abundantes mitosis, consiguiéndose supervivencia celular entre ocho y quince pases, a excepción del cultivo HC-444 que se adaptó a las condiciones *in vitro*.

Algunos cultivos celulares presentaron células de pequeño tamaño, de citoplasma denso, con núcleos claros (Figura 30A). Otras veces la morfología era alargada con largas expansiones citoplasmáticas (Figura 30B). La presencia de finas prolongaciones citoplasmáticas fue frecuente durante el crecimiento celular (Figura 30C). En algunas ocasiones los citoplasmas eran claros y con núcleos poco visibles (Figura 30D). Los nucléolos eran evidentes en la mayoría de las veces.

En los cultivos, también fue frecuente la presencia de células poligonales. En algunos cultivos y desde fases tempranas las células adquirieron mayor pleomorfismo.

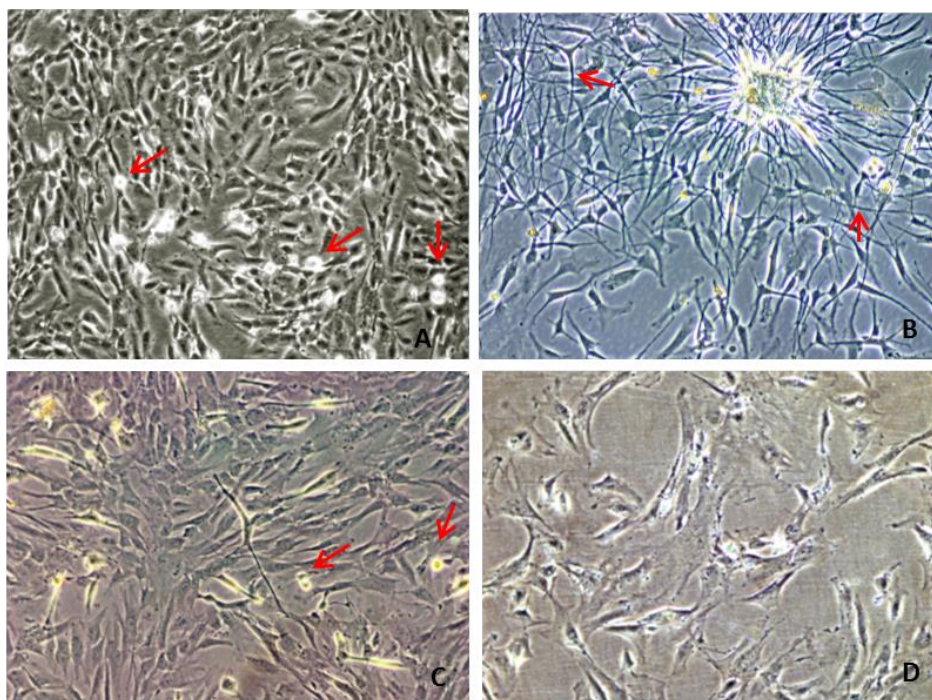


Figura 30. Morfología de las células de GB en cultivo. **A)** Cultivo HC-444: Crecimiento fundamentalmente en círculos, con células de tamaño pequeño, con numerosas mitosis (flechas) **B)** Cultivo HC-466: Células de morfología alargada con expansiones citoplasmáticas (flecha). Sobre las células pegadas crecieron otros grupos de células con poca capacidad de adhesión. **C)** Cultivo HC-534: Células con morfología variable, se observaron muchas mitosis (flechas). **D)** Cultivo HC-634: Células con citoplasmas claros y núcleos poco evidentes, algunas binucleadas.

En el estudio inmunohistoquímico de los cultivos celulares se analizó la expresión de GFAP, EGFR, p53 y Ki67/MIB-1 (Tabla 44).

La expresión de GFAP fue positiva en el citoplasma de las células de los cultivos celulares estudiados. En todos los cultivos la expresión fue valorada con un nivel 3, correspondiente a más del 75% de la población de células neoplásicas (Figura 31).

Para la expresión de EGFR, se determinó su positividad en la membrana citoplasmática y en el citoplasma. El cultivo HC-466 presentó un nivel de expresión alto (nivel 3); los cultivos HC-439 y HC-534 presentaron

un nivel de expresión intermedio (nivel 2); la expresión fue focal, en células aisladas (nivel 1), en los cultivos U87, U118 y HC-444. No se observó expresión en los cultivos HC-468 y HC-634 (Figura 31).

Se analizó la expresión de p53. En los cultivos U118, HC-444 y HC-466 se detectó expresión positiva con un nivel 3, correspondiente a una positividad del más del 50% de las células del cultivo (Figura 31); y en los cultivos HC-439, HC-468, HC-534, HC-634 y U87 la expresión fue de un nivel 2 correspondiente a un 25-50% de las células del cultivo.

La expresión de Ki67/MIB-1 mostró índices de proliferación de las células mayores al 30% en cuatro cultivos celulares U87, U118, HC-444 y HC-466; y un índice inferior al 30% en los cultivos HC-439, HC-468, HC-534 y HC-634 (Figura 31).

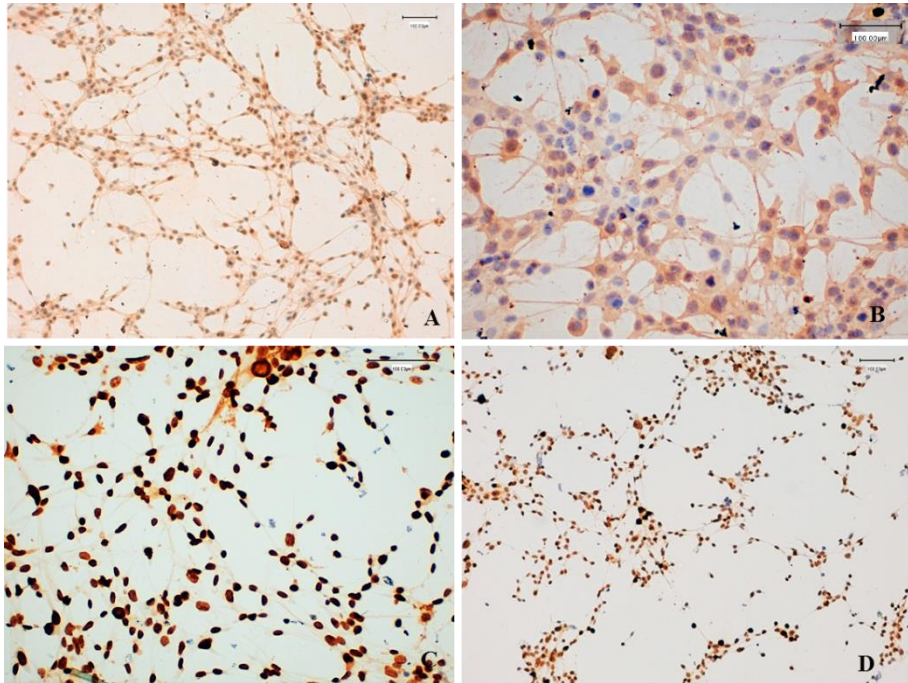


Figura 31. Expresión inmunohistoquímica del cultivo celular HC-466. A) Expresión de la proteína GFAP (nivel 3). **B)** Expresión de EGFR (nivel 3). **C)** Expresión de p53 (nivel 3). **D)** Expresión de Ki67 (70% de las células).

Tabla 44. Resultados inmunocitoquímicos de los cultivos celulares de GB.

Cultivos	GFAP	EGFR	p53	Ki67(%)
HC-439	3	2	2	23
HC-444	3	1	3	56
HC-466	3	3	3	70
HC-468	3	0	2	22
HC-534	3	2	2	14
HC-634	3	0	2	11
U87	3	1	2	47
U118	3	1	3	35

4.5.1.2 Caracterización genética

La caracterización genética de los cultivos celulares se realizó mediante estudios citogenéticos, estudio de la VNC mediante MLPA del gen *EGFR*, y sobre la secuenciación de *TP53*.

Patrón citogenético mediante cariotipo

Se estudió el cariotipo de los seis cultivos primarios obtenidos, y se corroboró el de las líneas celulares establecidas U87 y U118. La nomenclatura se ha realizado según el International System for Human Cytogenetic Nomenclature ²⁵².

Se analizaron en todos los casos el número máximo de metafases obtenidas, que oscilaron entre 3 y 25 (Tabla 45).

Los rangos cromosómicos de los distintos cultivos celulares de GB variaban desde el hipodiploide al hiperdiploide, con presencia en muchos de los casos de poliploidías. La trisomía del cromosoma 7 estuvo presente en todos los casos que resultaron valorables, y las monosomías 10 y 22 en algunos de ellos. La presencia de reestructuraciones fue muy importante, y en algunos de los cariotipos no fue posible detallarlos debido a su gran heterogeneidad.

Tabla 45. Resultados de los cariotipos de los cultivos celulares.

Cultivo	Rango	Cariotipo
HC-439	Hiperdiploide	47-49,XY,+3,del(3p),+7,+8,del(9q),-10,-17,-2,+mar
HC-444	Hiperdiploide	47-55,XY,der(1)t(1;19),+del(1),del(2q),t(3;13),+7,der(11)t(11;14)rob(14),+15,+18,+der(19)t(3;19)x2,+20Poliploidías.
HC-466	Hipotriploide	No valorable
HC-468	Hiperdiploide	No valorable. Poliploidías
HC-534	Hipodiploide	42-44,XX,+7,-10,-19,-22
HC-634	Hiperdiploide	No valorable
U87	Hiperdiploide	44-55,X,der(1)t(1;3)(p22;q21),+7,der(16)t(1;16)(p22;p12),del(9)(p13),+9mar. Diferentes pérdidas. Poliploidías
U118	Hiperdiploide	+7,t(11;5), t(8q;4), t(19;?18). Poliploidías

Caracterización mediante FISH

Los estudios de FISH se han realizado sistemáticamente con la sonda EGFR/CEP-7, para el estudio del centrómero del cromosoma 7 y para estudiar el gen *EGFR*, sobre las extensiones obtenidas de los cultivos celulares. Los resultados del análisis de FISH se detallan en la tabla 46.

Tabla 46. Estudio de EGFR/CEP-7 por FISH. Alto y bajo grado de amplificación (H-amp; L-amp). No amplificación (N-amp). T (trisomías), P (polisomías).

Cultivo	EGFR	CEP-7
HC-439	L-amp	T
HC-444	N-amp	T/P
HC-466	H-amp	T
HC-468	N-amp	T/P
HC-534	L-amp	T
HC-634	N-amp	T
U87	N-amp	T/P
U118	N-amp	T/P

Los cultivos HC-466, HC-439 y HC-534 presentaron amplificación de *EGFR*. En el HC-466 se detectó un alto nivel de amplificación en el 55%

de sus células, y en las metafases presencia de dobles minutos (Figura 32A). Los cultivos HC-439 y HC-534 presentaron un bajo nivel de amplificación, en menos de un 15% de sus células, y en las metafases se observó inserciones de este gen en los cromosomas 7 (Figura 32B). El resto de cultivos analizados no presentaron amplificación de *EGFR*, y las metafases presentaban dos copias para el gen (Figura 32C). Las líneas celulares comerciales no presentaron amplificación de este gen.

Con respecto a la presencia de trisomías y polisomias del cromosoma 7, pudimos detectar trisomías en todos los cultivos estudiados, y además polisomias en los cultivos HC-444, HC-468, U87 y U118.

En todos los cultivos celulares primarios se pudo comprobar que el resultado de FISH en relación a la amplificación del gen *EGFR*, se correspondía al resultado obtenido en el tumor primario incluido en parafina. Con respecto al centrómero del cromosoma 7, no se detectaron polisomías en los cultivos HC-439, HC-466 y HC-534, que se detectaron en los tumores.

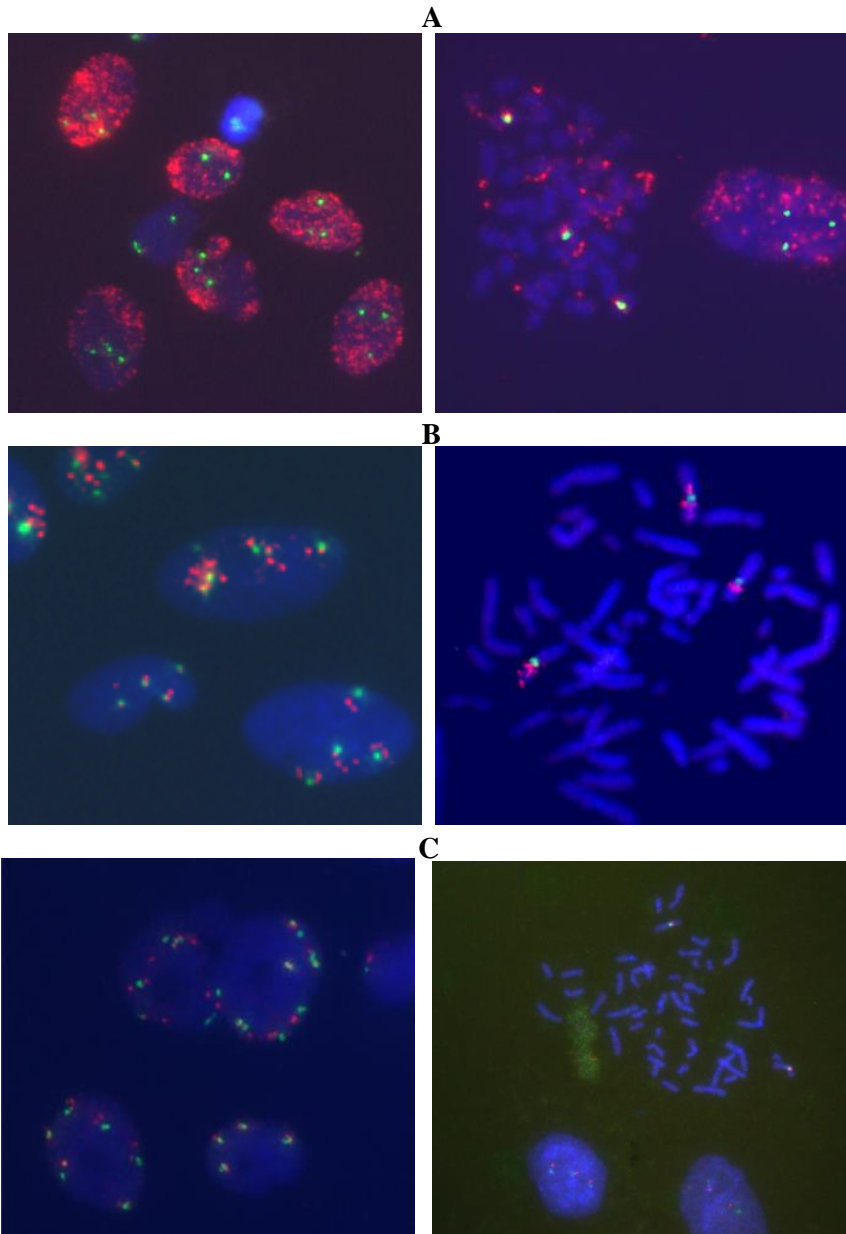


Figura 32. Estado de *EGFR* observado en núcleos interfásicos (izquierda) y metafases (derecha). A) Alto nivel de amplificación. B) Bajo nivel de amplificación. C) No amplificación. Núcleos con trisomías del cromosoma 7 (A y B). Núcleos con polisomías del cromosoma 7 (B y C izquierda).

Variación en el número de copias de EGFR con MLPA

Con respecto al estudio de la variación en el número de copias de *EGFR*, se observó que en el cultivo HC-466 el aumento en el número de copias fue alta en seis de sus exones (media: 9.54). En el cultivo HC-534 se observó un aumento bajo en el número de copias en cuatro de sus exones (media: 1.37); y en el resto de los cultivos el estatus de *EGFR* fue normal. Estos resultados fueron coincidentes con los obtenidos al realizar el análisis por FISH. En el caso del cultivo HC-439 por FISH se detectó una baja amplificación de *EGFR* que no fue detectada por la MLPA.

En cuanto a la presencia de la variante mutante *EGFRvIII* solo estuvo presente en el cultivo HC-466 (Tabla 47).

Tabla 47. Variación del número de copias en los exones del gen *EGFR*. Presencia de *EGFRvIII* (*). Estatus normal del gen (n), aumento alto en el número de copias (h), aumento bajo en el número de copias (l).

EGFR/ Cultivos	HC-439	HC-468	HC-444	HC-634	HC-534	HC-466*	U118	U87
Exon 01	n	n	n	l	n	h	n	n
Exon 02	n	n	n	n	l	l	n	n
Exon 03	n	n	n	n	l	l	l	n
Exon 04	n	n	n	l	l	l	n	n
Exon 05	n	n	n	n	n	l	n	l
Exon 06	n	n	n	n	l	l	n	l
Exon 07	l	n	n	n	n	h	n	n
Exon 08	n	n	n	n	n	h	n	n
Exon 13	n	n	l	l	n	h	l	n
Exon 18	n	n	n	n	n	h	n	n
Exon 25	n	n	n	l	n	h	n	n

Secuenciación de TP53

Se estudiaron las mutaciones en los exones 5, 6, 7 y 8 del gen *TP53* en los cultivos primarios y líneas celulares estudiadas. En el análisis de este gen se encontró una mutación en el exón 6, en homocigosis p.R213Q de

tipo sustitución - missense (c.638G>A) presente en la línea U118 (Figura 33).

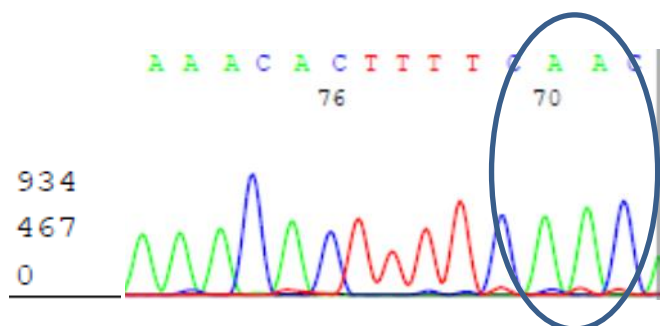


Figura 33. Secuenciación de *TP53*. Mutación en homocigosis p.R213Q exón 6 en la línea U118.

4.5.2 Estudios de transfección en los cultivos celulares

Para este estudio se utilizaron los seis cultivos primarios y las dos líneas celulares comerciales.

Previamente se comprobó la viabilidad celular de cada cultivo celular, y además que estuvieran libres de micoplasmas.

4.5.2.1 Viabilidad celular inicial

La viabilidad de los cultivos a estudiar se comprobó cuantificando la cantidad de células vivas mediante la tinción de azul tripan y contabilizándolas mediante un nucleocounter. Los resultados se muestran en la tabla 48.

Tabla 48. Resultados de la viabilidad celular inicial.

Cultivos	Conc. Inicial (cel/ml)	%células vivas	Diámetro celular (µm)
HC439	5,9E+05	100	18,23
HC444	3,0E+06	90	13,31
HC466	9,0E+05	90	17,92
HC468	3,4E+05	93	14,72
HC534	2,5E+06	99	14,98
HC634	4,1E+05	91	16,82
U87	3,0E+05	100	13,67
U118	9,0E+04	90	17,18

Los cultivos de tumores primarios y las líneas celulares tenían una adecuada concentración celular para el estudio. La viabilidad al inicio del estudio fue igual o superior al 90%; el diámetro de las células estaba entre 13 y 18,4 µm (Figura 34; tabla 48).

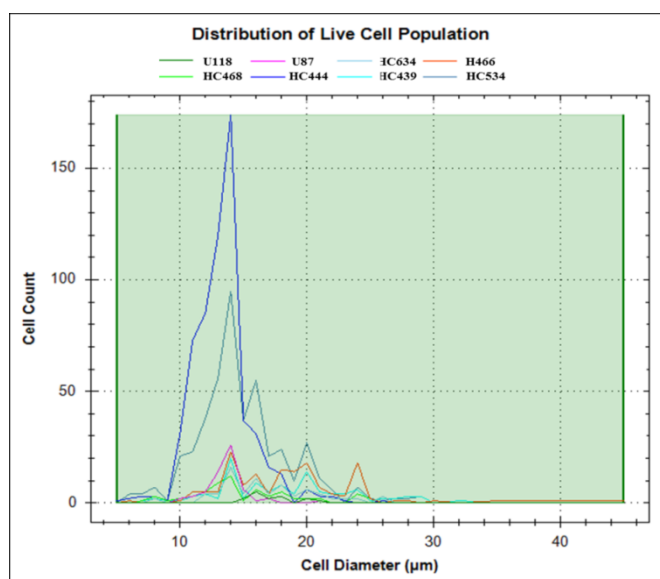


Figura 34. Distribución de la población de células vivas. Relación del número de células vivas con su diámetro en los cultivos celulares estudiados.

El control de micoplasmas realizado en todos los cultivos mediante PCR confirmó que estaban libres de micoplasmas (Figura 35).

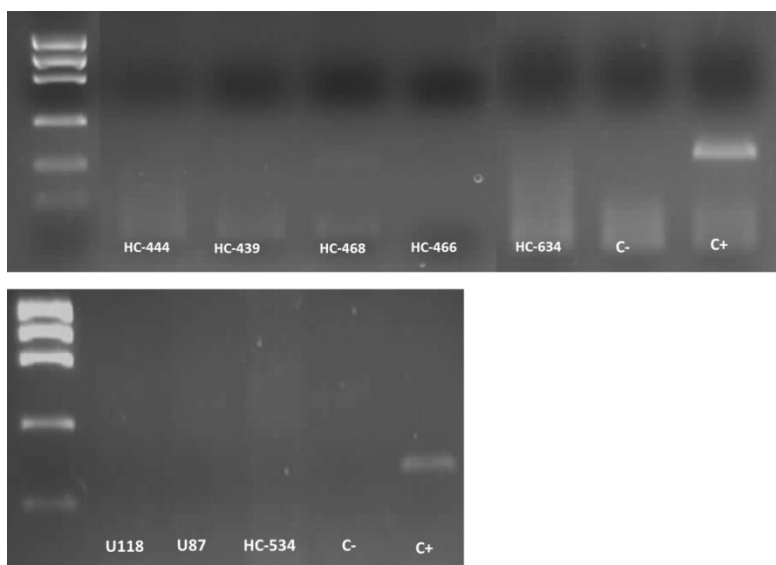


Figura 35. Detección de micoplasmas en cultivos celulares. Control positivo de presencia de micoplasma en la última posición del gel.

4.5.2.2 Transfección del miR-200c en los cultivos celulares

Fueron transfectados los seis cultivos primarios y las dos líneas celulares mediante el método de lipofección basado en la formación de complejos entre lípidos catiónicos y RNA, el cual tiene afinidad por la membrana y permite la entrada en la célula (Figura 36).

Primeramente se puso a punto el método haciendo un estudio previo de la cantidad de células en crecimiento que son óptimas para tener a las 24 horas una confluencia del 80%, la cual es idónea para el ensayo de transfección. Además, se calcularon las concentraciones de miRNA y RNAi a utilizar, así como los volúmenes de cada reactivo.

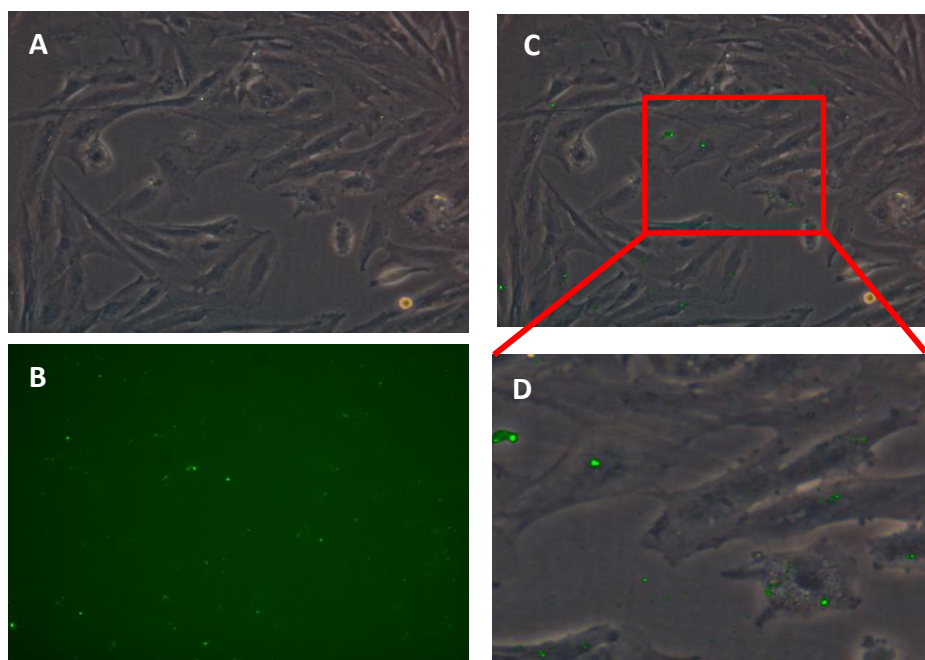


Figura 36. Transfección de células de GB en cultivo de la línea U118. A) Imagen de cultivo celular por contraste de fases 10x. **B)** Células transfectadas con el control positivo fluorescente de transfección miRNA marcado 3'-fluorescein, 10x. **C)** Superposición de las imágenes A y B, 10x. **D)** Sección de la imagen ampliada 20x.

Inhibición del miR-200c

Las células fueron transfectadas con miRNA inhibidor Hsa-mir-200c-3p (mirVana). En cada uno de los cultivos se utilizaron controles de eficiencia de la transfección. Como control negativo de la transfección se utilizó el miRNA inhibidor Negative Control #1 (mirVana) y como control positivo miRNA inhibidor let-7c Positive Control (mirVana).

Los resultados del análisis de la eficiencia de la inhibición del miR-200c se obtuvieron analizando la expresión del miR-200c y de genes dianas de los controles internos de transfección mediante qRT-PCR.

El control positivo let-7c regula negativamente el mRNA de HMGA2. Este gen codifica para una proteína que a su vez puede modular la expresión génica a través de cambios en la arquitectura de la cromatina. El miRNA let-7c regula a la baja los niveles de mRNA de HMGA2. Cuando se transfecta en células humanas, el miRNA inhibidor de let-7, resulta un aumento de los niveles del mRNA del gen *HMGA2*. Por lo tanto, la actividad inhibidora de miRNA let-7c puede ser monitorizado en las células humanas utilizando qRT-PCR para detectar mRNA de *HMGA2* como control positivo de la transfección y como control de la eficiencia de la inhibición del miR-200c. El control interno de la transfección, que fue la inhibición del miR-let-7, provocó el aumento de la expresión del mRNA de *HMGA2*, dos veces más que la expresión del control, lo que nos indicó la alta eficiencia del ensayo de transfección (Figura 37).

En todos los cultivos estudiados se logró la inhibición del miR-200c. En la normalización de nuestros resultados, si tomamos que el control negativo tiene una expresión del 100% de miR-200c, podemos observar que la inhibición de este fue total en los cultivos HC-444, HC-534 y U118. La inhibición en valores de expresión fue parcial en los cultivos HC-439, HC-466, HC-634 y U87, pero con un nivel de expresión inferior al 40% en todos los casos, lo que nos indica un predominio de células transfectadas en todos los cultivos.

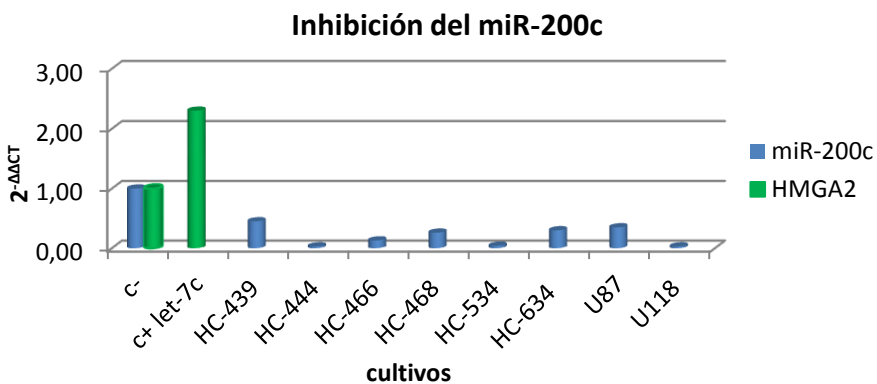


Figura 37. Inhibición del miR-200c en los cultivos celulares de GB.

Sobreexpresión del miR-200c

Las células fueron transfectadas con miRNA mimic Hsa-mir-200c-3p (mirVana). En cada uno de los cultivos se utilizaron controles de eficiencia de la transfección. Como control negativo de la transfección se utilizó el miRNA mimic Negative Control #1 (mirVana) y como control positivo miRNA mimic miR-1 Positive Control (mirVana).

Los resultados del análisis de la eficiencia de la sobreexpresión del miR-200c se detectaron analizando la expresión de este y de genes dianas de los controles internos de transfección mediante qRT-PCR.

El control positivo miR-1 está diseñado para actuar de la misma manera que la forma madura del mRNA del miR-1. El miR-1 se asocia con la baja regulación de muchos genes. En particular, mediada por miR-1 se detecta la baja regulación de la proteína tirosina quinasa 9 (PTK9) analizando la baja expresión de su mRNA. El control positivo mimic miR-1 se utiliza para los experimentos de transfección donde se necesita la sobreexpresión de un mRNA. Se puede supervisar la actividad de miR-1 a través del silenciamiento génico de PTK9, utilizando qPCR-RT para detectar el mRNA de PTK9.

El control interno de la transfección que fue la sobreexpresión del miR-1, provocó el silenciamiento del mRNA de PTK9, lo que nos indicó la eficiencia del ensayo de transfección (Figura 38).

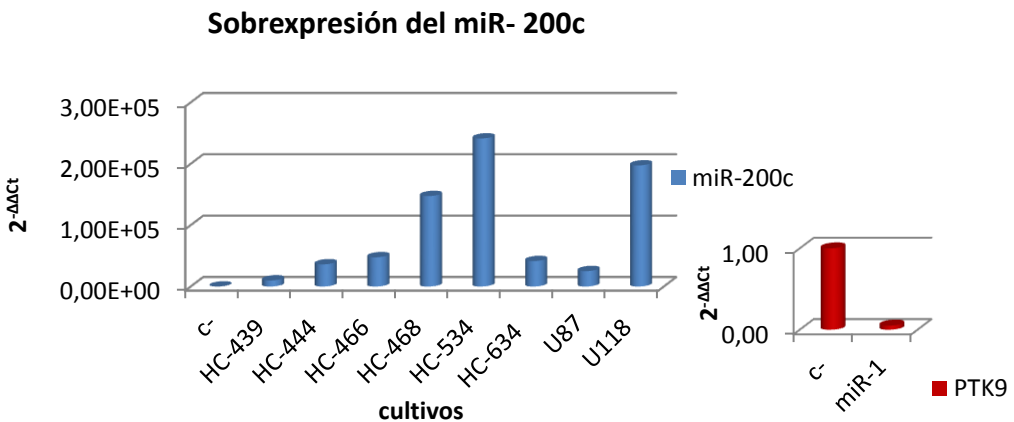


Figura 38. Sobreexpresión del miR-200c en los cultivos celulares de GB.

Todos los cultivos transfectados con el mimic miR-200c mostraron una sobreexpresión de este microRNA. Destacaron la expresión de los cultivos HC-468, HC-534 y U118.

La representación gráfica de datos de qRT-PCR, se muestran en la figura 39 para determinar la Ct a las cuales se suele detectar la expresión del miR-200c cuando este es inhibido o sobreexpresado en las células, en comparación con el nivel basal de expresión que llamamos control Ct (ciclo umbral), que es la intersección entre una curva de amplificación y una línea umbral (threshold). Es una medida relativa de la concentración del mRNA del gen de interés en la reacción de PCR. Estos valores, son inversamente proporcionales a la cantidad de DNA inicial.

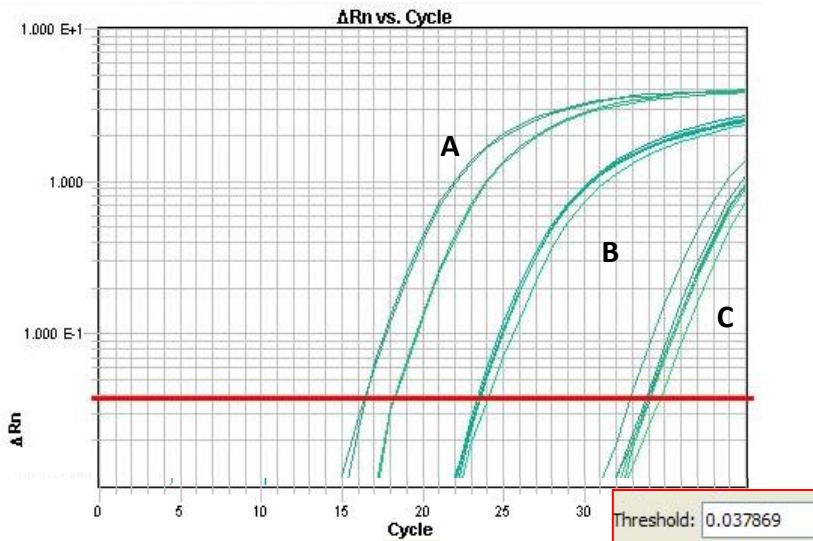


Figura 39. Representación gráfica de datos de qRT-PCR. Rn es la fluorescencia del RNAm control dividido por la fluorescencia de una sonda de referencia pasiva; Rn es la señal del informador normalizado a la señal de fluorescencia de un control interno. ΔRn es Rn menos la línea de base; ΔRn se representa frente al número de ciclos de PCR. **A)** Caso donde se ha transfectado las células con mimic miR-200c y se determina la sobreexpresión del miR-200c. **B)** Caso control de expresión de miR-200c. **C)** Caso donde se ha transfectado las células con inhibidor del miR-200c y se determina la baja expresión o ninguna del miR-200c.

Silenciamiento de EGFR

Las células fueron transfectadas con un silenciador de la expresión de EGFR (mirVana). En cada uno de los cultivos se utilizaron controles de eficiencia de la transfección. Como control negativo de la transfección se utilizó Silencer® Select Negative Control #1 siRNA (Ambion), y como control positivo el control fluorescente Alexa Fluor Red BLOQUE-iT (Invitrogen).

Los resultados del análisis de la eficiencia del silenciamiento de EGFR se detectaron analizando la expresión del mRNA mediante qRT-PCR. La casa comercial indica que pueden conseguirse niveles de silenciamiento de un 70% o más, o por el contrario niveles de expresión del mRNA no superiores al 30%.

El silenciamiento de EGFR se produjo en todos los cultivos celulares. Si tomamos que el control negativo tiene una expresión del 100% de EGFR, podemos observar que se silenció la expresión del EGFR hasta un nivel de expresión inferior al 30% en todos los casos, con excepción del cultivo HC-466 que alcanzó un 40% de expresión. Estos resultados nos indicaron un predominio de células transfectadas en todos los cultivos. En los cultivos HC-534 y U118 se logró el mejor nivel de silenciamiento de EGFR. En el cultivo HC-466 se logró silenciar el EGFR pero con un efecto menor en cuanto a la expresión comparado con el resto de cultivos. Este cultivo presentó una alta amplificación del gen *EGFR* detectada por FISH, un aumento del número de copias del gen por MLPA y la variante mutada EGFRvIII (Figura 40).

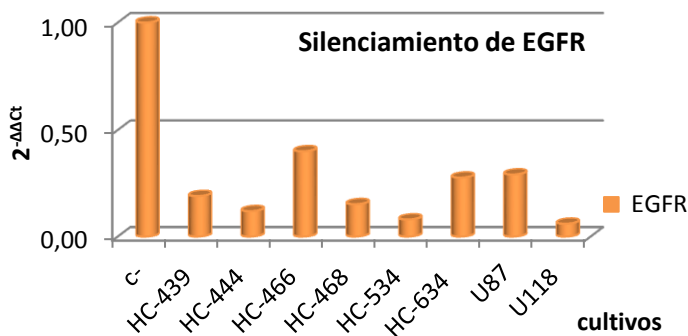


Figura 40. Silenciamiento de EGFR en los cultivos celulares de GB.

Los resultados de transfectar las células con el control positivo fluorescente se puede observar en la figura 41, donde de manera cualitativa se muestra la alta eficiencia de la transfección en la mayoría de las células.

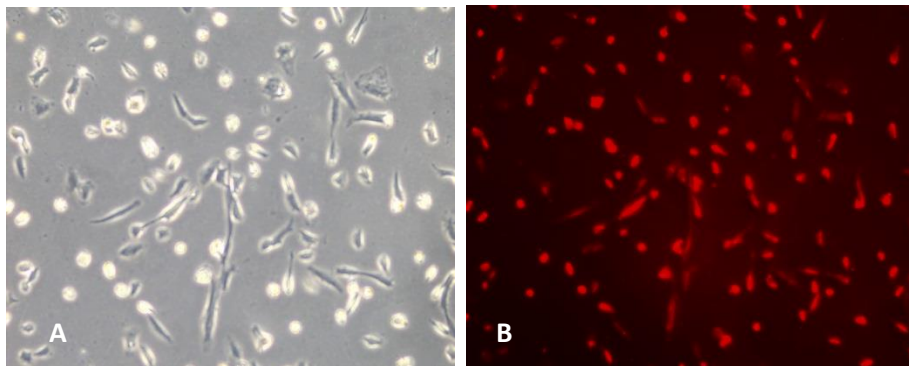


Figura 41. Transfección de células del cultivo HC-444, para lograr el silenciamiento de EGFR. A) Imagen contraste de fases de células transfectadas. B) Control Positivo de transfección fluorescente con Alexa Fluor Red.

4.5.3 Análisis de la expresión del mRNA de EGFR, CDH1 y ZEB1 en los cultivos celulares transfectados

En las tres condiciones analizadas anteriormente: inhibición de miR-200c, sobreexpresión de miR-200c y silenciamiento de EGFR, se estudiaron la expresión del mRNA de los genes relacionados con el miR-200c como *EGFR*, *ZEB1*, *CDH1*. Previamente, se analizó la situación normal de estos genes y del miR-200c en los cultivos celulares sin transfectar.

Para este trabajo se escogieron los siguientes cultivos: HC-466 que presentaba un alto nivel de amplificación de *EGFR*, HC-534 con un bajo nivel de amplificación, HC-444 sin amplificación de *EGFR*, y la línea celular establecida U118. En estos cultivos se lograron los mejores resultados durante la transfección y además son cultivos que representan a cada uno de los grupos de estudio según el estatus de amplificación de *EGFR*.

4.5.3.1 Cultivos celulares en situación control

Análisis de la expresión de EGFR

Los cultivos U118 y HC-444 que no presentaban amplificación de *EGFR* presentaron menor expresión de EGFR que los cultivos HC-534 y HC-466, con amplificación. A su vez, el cultivo HC-466 que presentaba alta amplificación de *EGFR*, mostró mayor expresión que el cultivo HC-534 que presentaba una baja amplificación del mismo. La expresión del cultivo HC-466 fue estadísticamente significativa ($8,47 \pm 0,17$, $p=0,02$) Así pues, se observa una correlación directa entre la amplificación y la expresión de EGFR.

Análisis de la expresión de miR-200c

Los cultivos con amplificación de *EGFR* (HC-534 y HC-466) presentaron una menor expresión del miR-200c con respecto a los cultivos sin amplificación de *EGFR* (U118 y HC-444), siendo más significativa la baja expresión del HC-466. La expresión de estos fue estadísticamente significativa ($0,3 \pm 0,03$, $p=0,03$ y $0,01 \pm 0,1$, $p=0,01$ respectivamente).

Análisis de la expresión de CDH1

No se observó expresión de caderina en ninguno de los cultivos estudiados.

Análisis de la expresión de ZEB1

Se pudo observar, una expresión creciente entre los cultivos HC-444 (sin amplificación), HC-534 (baja amplificación) y HC-466 (alta amplificación), pero inferior a la expresión de la línea U118.

Todos estos resultados se representan en la Figura 42.

En los cultivos amplificados (HC-466 y HC-534), se observó una regulación negativa en cuanto al miR-200c. En cuanto al *ZEB1*, los cultivos amplificados presentaron con respecto al cultivo no amplificado (HC-444) un aumento de la expresión mientras que con respecto a la línea celular (U118) su expresión era menor.

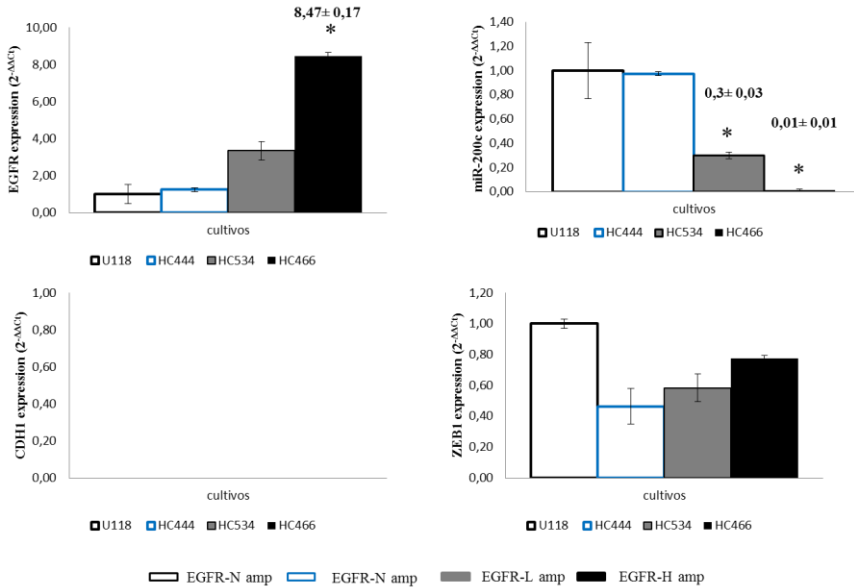


Figura 42. Análisis por qRT-PCR de la expresión de EGFR, miR-200c, CDH1 y ZEB1 en los cultivos celulares sin transfectar. * Estadísticamente significativo.

4.5.3.2 Cultivos transfectados con miR-200c: sobreexpresión e inhibición de miR-200c y silenciamiento de EGFR

Se analizaron los niveles de expresión de RNA de EGFR, CDH1 y ZEB1 por qRT-PCR en las tres situaciones. Los resultados se muestran en la tabla 49 y la figura 43.

Análisis de la expresión de EGFR

Inhibición de miR-200c: La expresión de EGFR de los cultivos no amplificados U118 y HC-444 mostraron altos nivel de expresión de este mensajero ($13,8 \pm 0,05$ $p=0,01$ y $14,6 \pm 0,01$ $p=0,00$ respectivamente) con respecto al control, mientras que los cultivos con amplificación HC-534 y HC-466 mostraron bajos niveles de expresión ($0,21 \pm 0,01$ $p=0,01$ y $0,01 \pm 0,2$

p=0,01) con respecto a sus controles. En todos los casos fue estadísticamente significativo.

Sobreexpresión de miR-200c: Los cultivos no amplificados U118 y HC-444 mostraron una expresión de 9,2 y 2 respectivamente, ambas más alta que el control. Sin embargo, los cultivos amplificados, mostraron una expresión mas baja que su control estadísticamente significativa ($0,1 \pm 0,0,01$ p=0,005; $0 \pm 0,0$ p=0,01 respectivamente).

Silenciamiento del EGFR: Se observó una bajada significativa de la expresión de este gen en todos los cultivos con respecto al control; destacando que el silenciamiento de EGFR logrado en el cultivo con mayor nivel de amplificación de *EGFR* fue menor que en el resto de cultivos, aunque también significativo (hay que tener en cuenta que este cultivo presentaba la variante mutada *EGFRvIII*). En U118 y HC-444 fue de $1,4 \pm 0,03$, p=0,005 y $0,01 \pm 0,1$ p=0,01; y en los cultivos HC-534 Y HC-466 fue de $0,5 \pm 0,01$ p=0,001 y $0,4 \pm 0,0$ p=0,01 respectivamente.

Análisis de la expresión de ZEB1

Inhibición de miR-200c: Los cultivos sin amplificación de *EGFR* (U118 y HC-444) mostraron una expresión de ZEB1 superior al control (1,8 y 3,1 respectivamente), mientras que los cultivos con amplificación (HC-534 y HC-466) mostraron una baja expresión de ZEB1 (0,4 y 0,1 respectivamente). Los valores más significativos con respecto a sus controles fueron los de los cultivos HC-444 y HC-466 ($3,1 \pm 0,08$ p=0,03; $0 \pm 0,0$ p=0,001 respectivamente).

Sobreexpresión del miR-200c: Todos los cultivos (U118, HC-444, HC-534 y HC-466) mostraron una menor expresión de ZEB1 con respecto a su control (0,6; 0,4; 0,1; 0 respectivamente), siendo más significativa estadísticamente la de los cultivos con amplificación de *EGFR*, HC-534 Y HC-466 ($0,01 \pm 0,06$ p=0,04; $0 \pm 0,0$ p=0,00 respectivamente).

Silenciamiento de EGFR: Los cultivos sin amplificación (U118 y HC-444) presentaron una baja expresión de ZEB1 (0,4 y $0,1 \pm 0,01$ p=0,001

respectivamente), mientras que los cultivos con amplificación (HC-535 y HC-466) presentaron una expresión ligeramente inferior y superior al control (0,95 y 7,7±0,03 p=0,04 respectivamente) (hay que tener en cuenta que el HC-466 presentaba el *EGFRvIII*).

Análisis de la expresión de CDH1

La expresión de CDH1 no fue detectada en ninguna de las situaciones del estudio de transfección.

Tabla 49. Expresión de EGFR y ZEB1 en los cultivos estudiados en las diferentes situaciones de transfección.

U118	EGFR	ZEB1
Normal	1	1
Inibición miR- 200c	13,8	1,81
Sobreexpresión miR-200c	9,2	0,5
Silenciamiento EGFR	0,1	0,4
HC-444	EGFR	ZEB1
Normal	1	1
Inibición miR- 200c	14,6	3
Sobreexpresión miR-200c	1,96	0,4
Silenciamiento EGFR	0,01	0,05
HC-534	EGFR	ZEB1
Normal	1	1
Inibición miR- 200c	0,21	0,37
Sobreexpresión miR-200c	0,13	0,09
Silenciamiento EGFR	0,14	0,95
HC-466	EGFR	ZEB1
Normal	1	1
Inibición miR- 200c	0	0,09
Sobreexpresión miR-200c	0	0
Silenciamiento EGFR	0,4	7,7

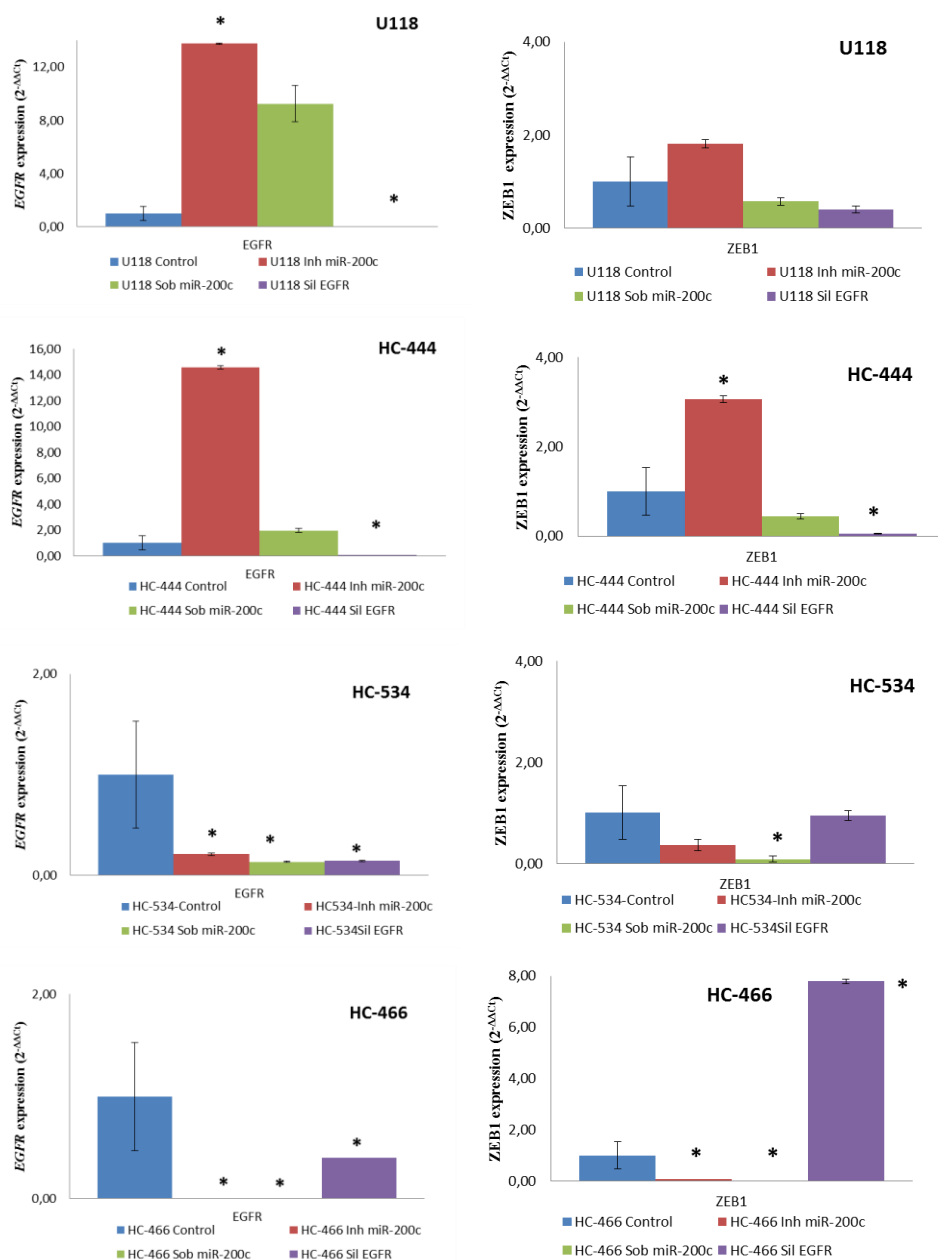


Figura 43. Análisis por qRT-PCR de la expresión de EGFR y ZEB1 en cultivos celulares transfectados.

Haciendo un resumen de estos resultados podemos validar que el miR-200c modula la expresión de ZEB1 cuando este miRNA se encuentra sobreexpresado. En este caso fue evidente el bloqueo automático de la expresión del ZEB1 en todos los cultivos estudiados. Sin embargo, cuando en los cultivos se inhibió el miR-200c, sólo se observó un aumento de la expresión de ZEB1 en los cultivos sin amplificación.

Por otra parte, y en cuanto a la expresión de EGFR, en situación de inhibición del miR-200c, se observó un aumento en la expresión de EGFR sólo en los cultivos sin amplificación.

Independientemente de las situaciones anteriores el silenciamiento de EGFR provocó una disminución de la expresión de EGFR en todos los cultivos, con una reducción casi total en los cultivos sin amplificación del gen. Así mismo, el silenciamiento de EGFR provocó una disminución de la expresión de ZEB1 en todos los cultivos con diferentes niveles, a excepción del cultivo HC-466 con alto nivel de amplificación, que a su vez se corresponde con el mutante *EGFRvIII*.

4.5.3.3 Estudio de la expresión de proteínas en cultivos transfectados

Mediante los estudios de western blot se estudiaron la expresión de las proteínas EGFR, CDH1 (E-caderina), y ZEB1 en los diferentes cultivos celulares en situación normal y transfectadas (Figura 44).

Los resultados de la determinación de la proteína EGFR en los cultivos celulares sometidos a las distintas situaciones de transfección y silenciamiento de EGFR mostraron una homogeneidad en la respuesta al silenciamiento de EGFR, con valores de 0 o próximos a 0. Ante la sobreexpresión de miR-200c, los cultivos HC-444, HC-534, HC-466, respondieron con una reducción clara en la producción de la proteína, no así la línea U118, que mostró un aumento claro de EGFR. Igualmente, la inhibición de miR-200c, provocó una respuesta heterogénea, con discretas disminuciones con respecto al control en la línea U118, el cultivo HC-534 y HC-466; frente a un discreto aumento en el cultivo HC-444.

Solo se observó una respuesta homogénea en los cultivos con amplificación de *EGFR*, en los cuales la transfección provocó, en ambas

situaciones (inhibición y sobreexpresión de miR-200c) una reducción en la síntesis de EGFR (Tabla 50).

Tabla 50. Expresión de la proteína EGFR en las diferentes situaciones

EGFR	Control	Inh.miR-200c	Sobr. miR-200c	Sil. EGFR
U-118	0.29	0.22	1.36	0.03
HC-444	0.23	0.75	0.24	0.01
HC-534	0.37	0.21	0	0
HC-466	1.15	0	0	0

La determinación de la proteína ZEB1 mostró valores de expresión bajos en los controles de las líneas celulares U-118, HC-444 y HC-466. Hubo una pérdida de expresión en la situación de inhibición de miR-200c (U-118, HC-444, HC-466) y en situación de silenciamiento (U-118, HC-534 y HC-466). Y no hubo expresión en ninguno de los cuatro cultivos en situación de sobreexpresión del miR-200c (Tabla 51).

Tabla 51. Expresión de la proteína ZEB1 en las diferentes situaciones

ZEB1	Control	Inh.miR-200c	Sobr. miR-200c	Sil. EGFR
U-118	0.27	0	0	0
HC-444	0.04	0.08	0	0.02
HC-534	0	0	0	0
HC-466	0.09	0	0	0

La determinación de la proteína CDH1 no mostró expresión para ninguno de los cultivos estudiados.

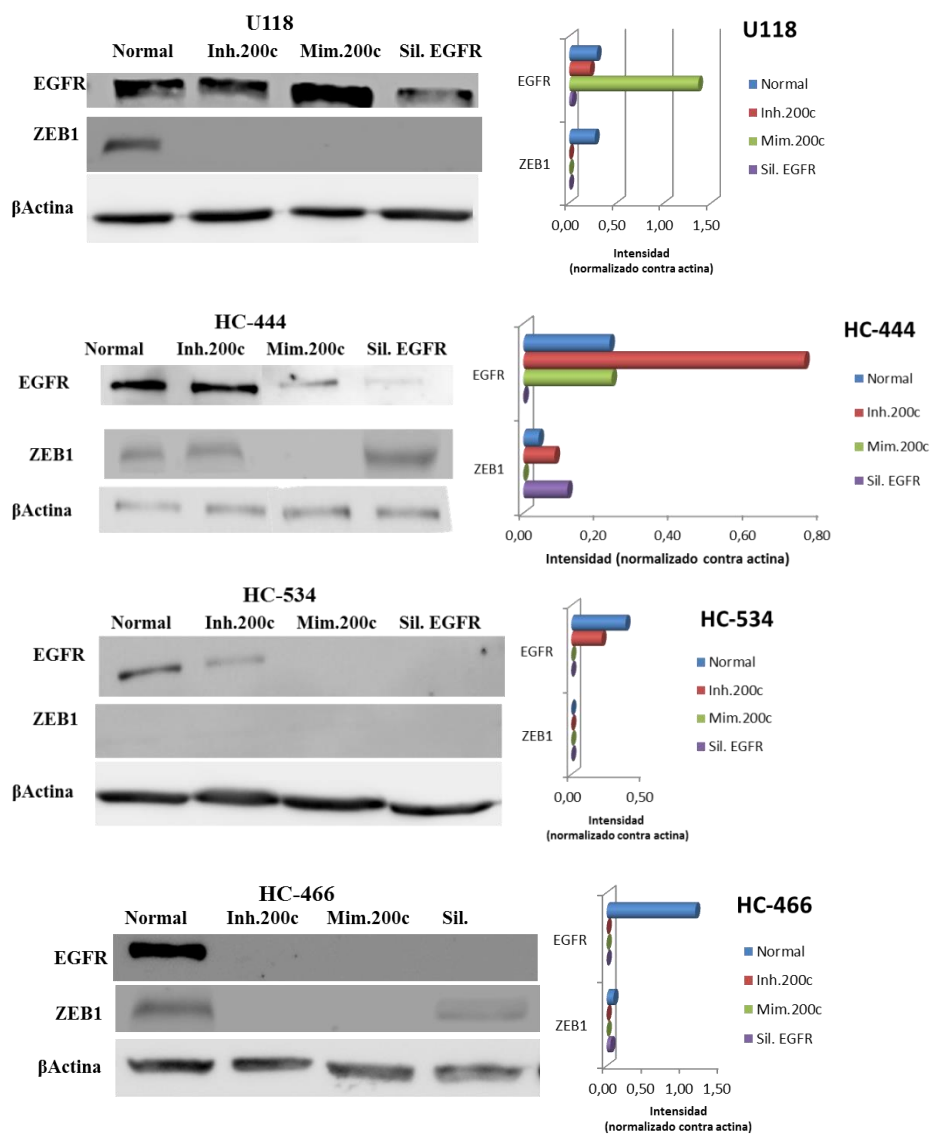


Figura 44. Expresión de proteínas en los cultivos U-118, HC-444, HC-534 y HC-466. A la derecha las bandas de proteínas en la membrana de western blot. A la izquierda los gráficos que representan la cuantificación de las mismas utilizando como proteína control la β -actina para el cálculo del ratio de expresión.

4.5.4 Estudio de la migración celular en las diferentes situaciones de transfección

El estudio de la migración celular se realizó sobre los cultivos U118, HC-444, HC-534 y HC-466. El U118 y el HC-444, sin amplificación de *EGFR*; el HC-534, con nivel bajo de amplificación; y el HC-466, con alta amplificación de *EGFR*. Este estudio se realizó en las siguientes situaciones: control, inhibición de miR-200c, sobreexpresión de miR-200c, y silenciamiento de *EGFR*.

Previamente realizamos un estudio de viabilidad celular más sensible al utilizado anteriormente para poder llevar a cabo este proceso.

4.5.4.1 Estudio de Viabilidad celular

En cada uno de los modelos de transfección estudiados, en los diferentes cultivos celulares (situación control, situación inhibición del miR-200c, situación de sobreexpresión del miR-200c y situación de silenciamiento de *EGFR*), se realizó el ensayo de viabilidad celular midiendo la producción de ATP de las células vivas a las 0, 24, 48 y 72 horas, tal y como muestra la figura 45.

En los cuatro cultivos utilizados el control presentó una viabilidad superior hasta aproximadamente las 48 horas al resto de situaciones transfectadas. Esto fue muy evidente en la línea celular U118, que persistió durante todo el tiempo de estudio, y poco evidente en el cultivo HC-466.

La situación de inhibición de miR-200c fue en la que se obtuvo menor viabilidad celular en todos los cultivos hasta las 24 horas; a partir de ese momento el comportamiento celular fue heterogéneo. En la situación de **sobreexpresión de miR-200c** la viabilidad celular fue mayor en todos los cultivos hasta aproximadamente las 30 horas, pero luego empezó a descender, a excepción del cultivo HC-466, que se mantuvo muy próximo a los niveles de la situación control. En situación de **silenciamiento de EGFR**, la viabilidad celular es la que se mantuvo más cercana a la situación control, especialmente en los cultivos con amplificación de *EGFR*, observándose diferente en la línea celular U118, donde persistió bastante por debajo de la situación control.

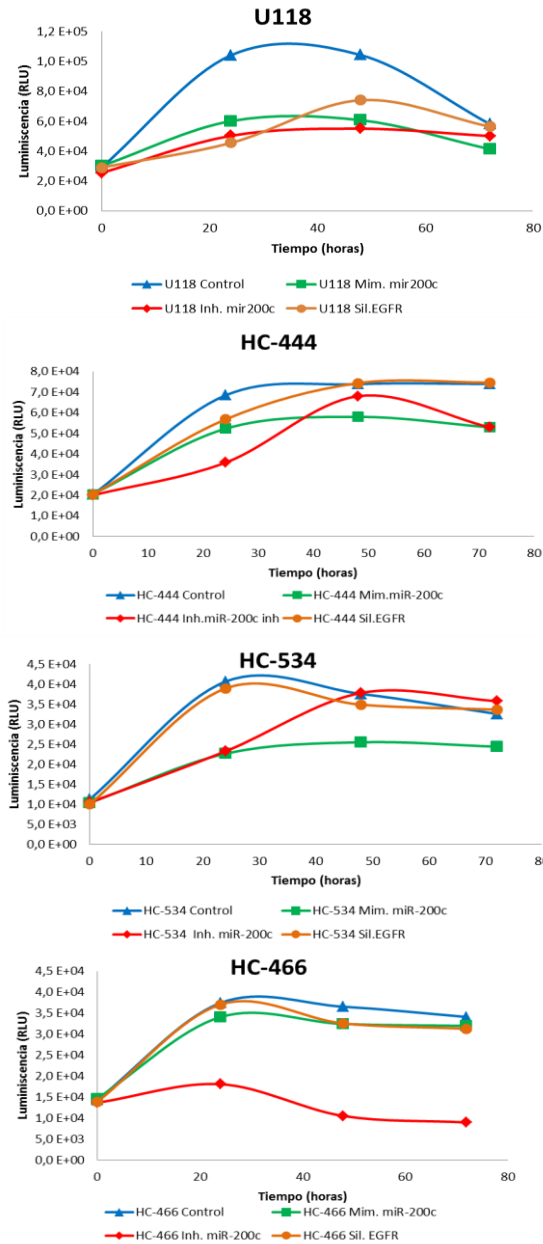


Figura 45. Estudio de viabilidad celular por luminiscencia, medida por la producción de ATP de cada célula.

4.5.4.2 Estudio de la migración celular

Para el estudio de la migración celular, utilizamos el “CytoSelect™ Wound Healing Assay Kit basado en un cultivo en monocapa de células confluentes que se mueven hacia una “brecha” o “herida”. La eliminación del inserto y estudio secuencial del crecimiento define la capacidad migratoria de las células.

El análisis se efectuó sobre las imágenes obtenidas secuencialmente, mediante un estudio automático, con revisión manual utilizando el programa de morfometría Image Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics), que permitió medir el área que queda libre después de la migración de las células y restarla al área inicial, para obtener el área ocupada por las células que migran. Los valores se expresaron en porcentajes del área ocupada por las células (Figura 46).

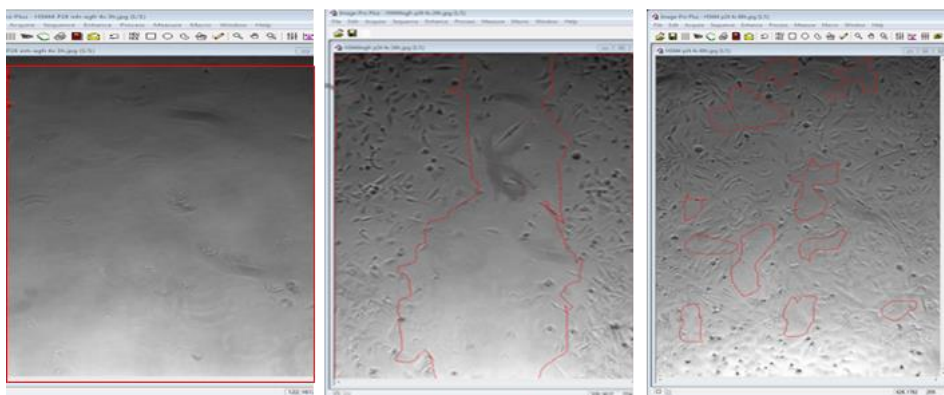


Figura 46. Análisis de las imágenes de migración celular de la línea U118, mediante el programa de morfometría Image Pro Plus 6.0.

Resultados entre las 0-3 horas

En el modelo celular de migración se observó que entre las 0 y 3 horas no era posible aún detectar actividad migratoria de las células, con excepción de los cultivos controles HC-466 y U118 que presentaron un estadio inicial de migración celular. En el cultivo H-466 cuando se silenció *EGFR* era posible cuantificar a las 3 horas una migración que era ligeramente superior al control (Figuras 47).

Resultados a las 6 horas

Los cultivos iniciaron una actividad migratoria cuantificable en tres de ellos. Así, U118 ocupó el 5,4% del área, HC-444 ocupó el 2% del área, y HC-466 el 3,6% del área total. El cultivo HC-534 se mantuvo estable. Los resultados en las tres situaciones analizadas fueron las siguientes:

Inhibición de miR-200c. Se produjo una respuesta heterogénea en los diferentes cultivos. Se observó un aumento en la migración celular en los cultivos HC-444 y HC-534 con valores del 3% y del 1,8% respectivamente. Frente a ellos, la línea U118 y el cultivo HC-466 presentaron una migración menor que se evidenció de forma clara con valores respectivos de 1,1% y 0%.

Sobreexpresión de miR-200c. Provocó una respuesta homogénea en todos los cultivos celulares estudiados, produciéndose una menor migración con valores del 0,1% en la línea U118, 1,3% en el cultivo HC-444, 0% en el cultivo HC-534 y 2% en el cultivo HC-466.

Silenciamiento de EGFR. Provocó una menor migración celular en U118 (2% del área), HC-444 (1,8 % del área) y en HC-466 (2,1% del área). Se observó un discreto aumento migratorio en el cultivo HC-534 con un área ocupada del 0,4%.

Estos resultados se observan en la tabla 52 y en la figura 47.

Tabla 52. Área de migración en porcentajes de los diferentes cultivos celulares a las seis horas. Color azul, aumento de migración, color rojo, menor migración, y color negro, igual migración.

Cultivos (6 horas)	Control	Inhibición miR-200c	Sobreexpresión de miR-200c	Silenciamiento de EGFR
U118	5,4%	1,1%	0,1%	2%
HC-444	2%	3%	1,3%	1,8%
HC-534	0%	1,8%	0%	0,4%
HC-466	3,6%	0%	2%	2,1%

Resultados a las 18 horas

El análisis de los cultivos mostró una importante actividad migratoria en U118 y HC-444 con valores del 19,9% y 31,4%

respectivamente. En los cultivos HC-534 y HC-466 esta actividad fue claramente menor, con valores respectivos del 2% y 3,3%.

Inhibición del miR-200c. Se produjo una activación en la migración de las células en los cultivos U118 (24,9%), HC-444 (46%) y HC-534 (11,3%), destacando una disminución de la actividad migratoria en el cultivo HC-466 (1,2%,) siendo esta respuesta en relación con su control discordante al resto de las anteriores.

Sobreexpresión de miR-200c. Se produjo una respuesta homogénea en los cuatro cultivos estudiados, provocando una inhibición de su actividad migratoria. Así tanto en U118 (0,6%), HC-444 (1,7%), HC-534 (1,1%) y HC-466 (2,9%), se observó una disminución del área ocupada en relación con el valor del área control en este período.

Silenciamiento de EGFR. Se provocó una respuesta heterogénea en la migración celular. Así en la línea U118, HC-444 y HC-534, se observó una disminución de la migración celular con valores respectivos del 3,9%, 13,8% y del 0,8%; mientras que en el cultivo HC-466 se observó un incremento en la migración celular.

Estos resultados se observan en la tabla 53 y en la figura 47.

Tabla 53. Área de migración en porcentajes de los diferentes cultivos celulares a las 18 horas. Color azul, aumento de migración, color rojo, menor migración, y color negro, igual migración.

Cultivos (18 horas)	Control	Inhibición miR-200c	Sobreexpresión de miR-200c	Silenciamiento de EGFR
U118	19,9%	24,9%	0,6%	3,9%
HC-444	31,4%	46%	1,7%	13,8%
HC-534	2%	11,3%	1,1%	0,8%
HC-466	3,6%	1,2%	2,9%	12,7%

Resultados a las 24 horas

El análisis de los cultivos celulares mostraron un claro incremento del área ocupada en todos los cultivos, con valores que definen una variabilidad en la capacidad migratoria, aunque la migración se produce en todos ellos de forma continua.

Inhibición de miR-200c. Se produjo una respuesta homogénea en tres de los cultivos, produciendo un incremento en la actividad migratoria en U118 (32,1%), en HC-444 (92,4%) y en HC-466 (5,9%). En el caso de HC-534 la migración apareció estable con un valor de 8,2%, produciéndose una mínima disminución de la migración con respecto a su control.

Sobreexpresión de miR-200c. Se produjo una clara inhibición de la migración celular en la línea U118 (2,1%), en el cultivo HC-444 (42,6%) y en HC-534 (1,2%). La respuesta del cultivo HC-466 a las 24 horas fue heterogénea, produciéndose una activación de la migración celular con valores de 12,5%, superiores al control.

Silenciamiento de EGFR. Se observó una respuesta heterogénea; a las 24 horas, la línea U118 ocupó un área de un 12,7%, el cultivo HC-444 el 72,4%, y HC-534 con el 4,1%, mostrando una inhibición de su actividad migratoria. Frente a ellas el cultivo HC-466 presentó aumento en la actividad migratoria con valores del 15,1%.

Estos resultados se observan en la Tabla 54 y en las Figura 47.

Tabla 54. Área de migración en porcentajes de los diferentes cultivos celulares a las 24 horas. Color azul, aumento de migración, color rojo, menor migración, y color negro, igual migración.

Cultivos (24 horas)	Control	Inhibición miR-200c	Sobreexpresión de miR-200c	Silenciamiento de EGFR
U118	31,2 %	32,1%	2,1%	12,7%
HC-444	89,5%	92,4%	42,6%	72,4%
HC-534	8,6%	8,2%	1,2%	4,1%
HC-466	4,6%	5,9%	12,5%	15,1%

Si realizamos el análisis de la migración celular de los cultivos en función de las tres situaciones planteadas y teniendo en cuenta el estado de amplificación de cada uno de los cultivos, se obtienen los siguientes resultados:

Cultivos con inhibición de miR-200c

Los cultivos HC-444 y U118 (cultivos sin amplificación de *EGFR*) mostraron un aumento de la migración celular progresiva en el tiempo con respecto a su control. El cultivo HC-534 (baja amplificación) mostró un aumento de la migración con respecto a su control a partir de las 18 horas y

permaneció estable a las 24 horas. El cultivo HC-466 (alta amplificación) mostró un comportamiento diferente en la migración, siendo a las 6 y 18 horas inferior a su control (Tabla 55).

Tabla 55. Área de migración en porcentajes de los diferentes cultivos con inhibición de miR-200c. Color azul, aumento de migración; color rojo, menor migración; Color blanco, igual migración. N-amp, no amplificación de *EGFR*.

L-amp, baja amplificación de *EGFR*, H-amp, alta amplificación de *EGFR*.

Inhibición miR-200c		6h	18h	24h
U118	N-amp			
HC-444	N-amp			
HC-534	L-amp			
HC-466	H-amp			

Cultivos con sobreexpresión de miR- 200c

En todos los cultivos celulares estudiados con sobreexpresión de miR-200c, se detectó una menor migración celular con respecto al cultivo control, con excepción del cultivo HC-466 que mostró un aumento de la capacidad de migración a las 24 horas con respecto al control. Los cultivos sin amplificación de *EGFR* (U118 y HC-444) mostraron una homogénea disminución de la migración de sus células (Tabla 56).

Tabla 56. Área de migración en porcentajes de los diferentes cultivos con sobreexpresión de miR-200c. Color azul, aumento de migración; color rojo, menor migración; Color blanco, igual migración. N-amp, no amplificación de *EGFR*. L-amp, baja amplificación de *EGFR*, H-amp, alta amplificación de *EGFR*.

Sobreexpresión de miR-200c		6h	18h	24h
U118	N-amp			
HC-444	N-amp			
HC-534	L-amp			
HC-466	H-amp			

Cultivos con silenciamiento de la expresión de EGFR

Los cultivos HC-444 y U118 (cultivos sin amplificación de *EGFR*) presentaron una menor migración que sus controles. El cultivo H-534 (baja amplificación de *EGFR*) a partir de las 18 horas presentó una menor migración que su control. En el cultivo HC-466 (alta amplificación de *EGFR*) se observó hasta las 6 horas una menor migración celular con respecto a su control, que aumentó a partir de las 18 horas del estudio (Tabla 57).

Tabla 57. Área de migración en porcentajes de los diferentes cultivos con silenciamiento de EGFR. Color azul, aumento de migración; color rojo, menor migración; Color blanco, igual migración. N-amp, no amplificación de *EGFR*. L-amp, baja amplificación de *EGFR*, H-amp, alta amplificación de *EGFR*.

Silenciamiento de EGFR		6h	18h	24h
U118	N-amp	Red	Red	Red
HC-444	N-amp	Red	Red	Red
HC-534	L-amp	Blue	Red	Red
HC-466	H-amp	Red	Blue	Blue

Analizando la migración de los cuatro cultivos resaltaríamos los siguientes resultados:

-En la línea celular **U118**, que no presenta amplificación de *EGFR*, obtuvimos aumento de la migración celular cuando se inhibió el miR-200c, y disminución de la migración cuando se produjo sobreexpresión del miR-200c y cuando hubo silenciamiento de *EGFR* (Figura 47).

- En el cultivo primario **HC-444**, que no presentaba amplificación de *EGFR*, el comportamiento fue muy similar a la de la línea celular U118 (Figura 47 y 48).

-En el cultivo primario **HC-534**, con baja amplificación de *EGFR*, el comportamiento fue ligeramente diferente pero con mayor similitud al comportamiento migratorio del los cultivos sin amplificación de *EGFR* (Figura 47).

-En el cultivo primario **HC-466**, con alta amplificación de *EGFR*, el comportamiento fue más heterogéneo, con tendencia a aumentar el área de

migración a partir de las 24 horas, y en las tres situaciones estudiadas. (Figura 47).

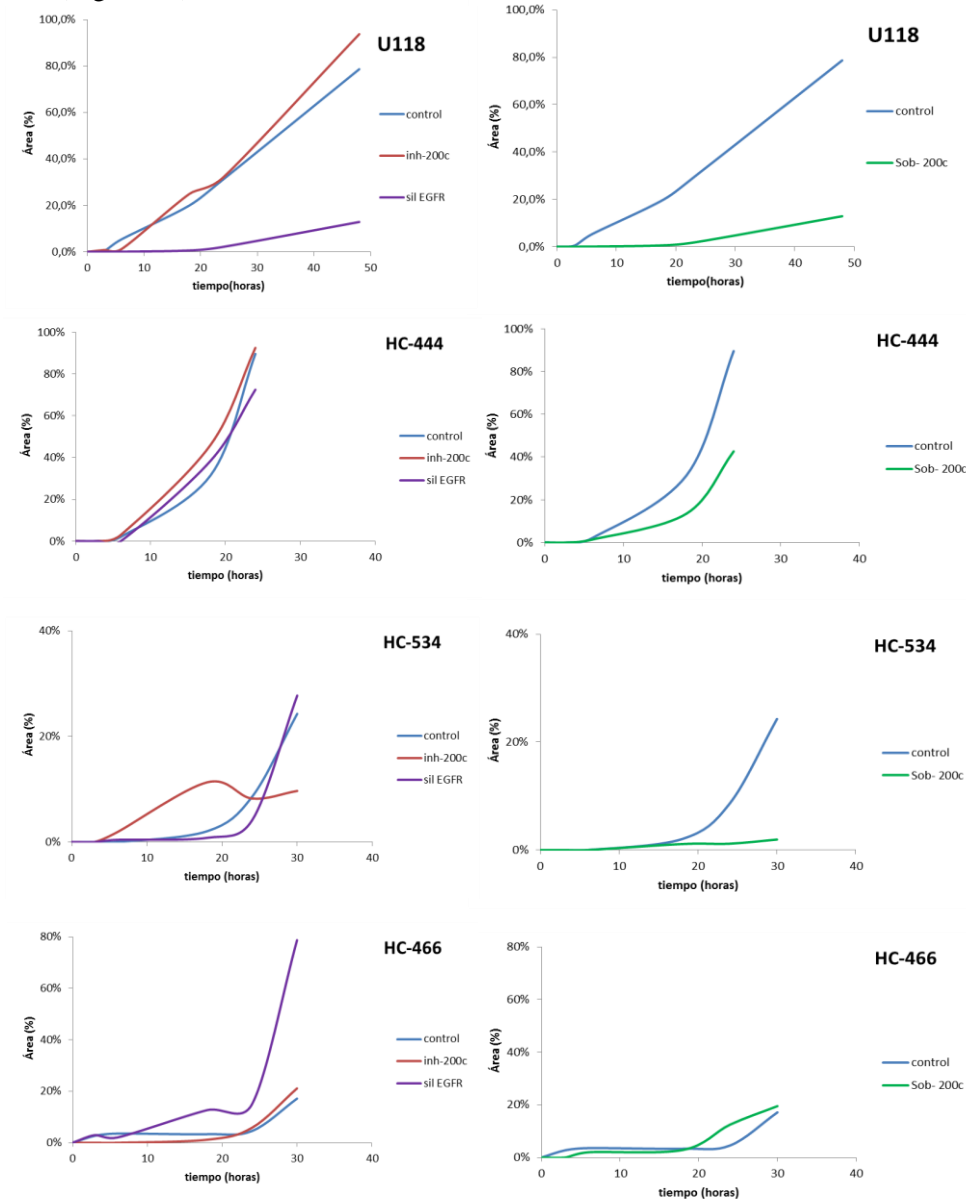


Figura 47. Cuantificación del área de migración celular. Color azul: Células control. Color rojo: Células con inhibición de miR-200c. Color verde: Células con sobreexpresión de miR-200c. Color morado: Células con EGFR silenciado.

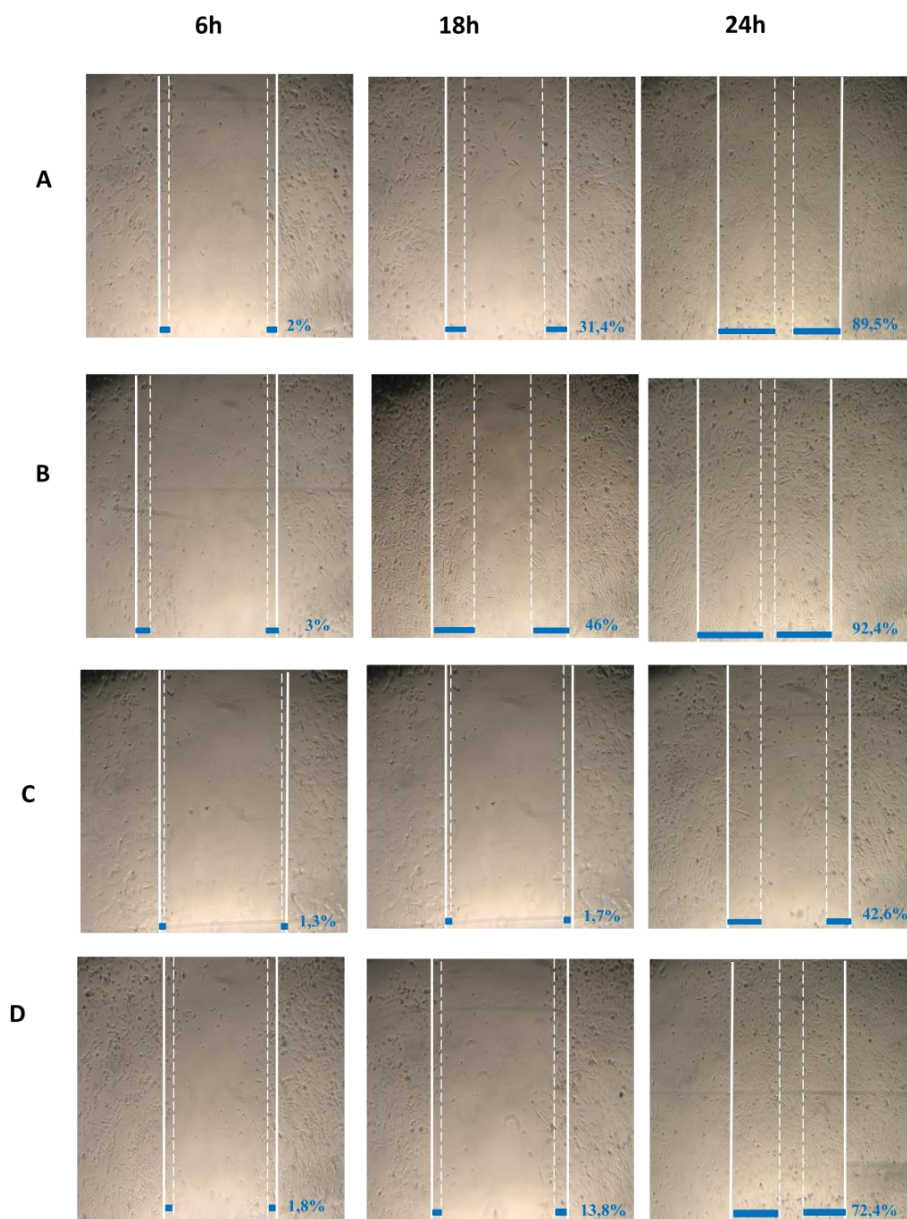


Figura 48. Modelo experimental en cultivos celulares. Estudio secuencial de migración celular en el cultivo HC-444. **A)** Células control. **B)** Células con inhibición del miR-200c. **C)** Células con sobreexpresión de miR-200c. **D)** Células con EGFR silenciado.

El análisis de los efectos sobre la migración celular en los diferentes cultivos, al provocar cambios en miR-200c y con el silenciamiento de EGFR, permitió destacar que la sobreexpresión de miR-200c provocó una respuesta inhibitoria homogénea en la migración celular, que se observa en los cultivos celulares a las 3, 6, 18 y 24 horas (figura 48) a excepción del cultivo HC-466, el cual es un cultivo que muestra amplificación de *EGFR* y presencia de la variante mutante *EGFRvIII*, la cual a las 24 horas no responde a la ribointerferencia de miR-200c.

En la inhibición del miR-200c el aumento en la migración se produjo en tiempos distintos según los cultivos: El HC-444 y el HC-534 desde las seis horas, el U118 desde las 18 horas, y el HC-466 a partir de las 24 horas.

En el silenciamiento de EGFR la disminución en la migración fue heterogénea en los diferentes cultivos celulares; la disminución de la migración se observó en el U118 y el HC-444 desde las seis horas, en el HC-534 desde las 18 horas y en el HC-466 tuvo un comportamiento variable en los distintos tiempos.

En cuanto a la relación con la amplificación de *EGFR* los cultivos sin amplificación de *EGFR* respondieron homogéneamente, tanto a la sobreexpresión de miR-200c, como al silenciamiento de *EGFR*, produciéndose una inhibición de la migración.

Los cultivos con amplificación de *EGFR* respondieron homogéneamente a la sobreexpresión de *EGFR* hasta las 18 horas del cultivo; a la inhibición del miR-200c respondieron escalonados en el tiempo; y no respondieron o lo hicieron de forma heterogénea al silenciamiento de *EGFR* en particular el cultivo HC-466.

5. DISCUSIÓN

5.1 Caracterización clínica, histopatológica e inmunohistoquímica

El glioblastoma, es la neoplasia primaria del SNC más importante en adultos, por su frecuencia y agresividad. Su localización en el SNC, su alta capacidad invasiva y destructiva, y su presentación clínica, hacen de este una enfermedad neoplásica altamente invalidante y de evolución fatal, en la que las distintas acciones terapéuticas se han mostrado ineficaces hasta el momento. El GB muestra, dentro de los procesos neoplásicos, un comportamiento paradigmático en los procesos de infiltración, como inductor de angiogénesis y de otros procesos oncogénicos, que lo han convertido en una diana de estudio y análisis de respuesta a distintos métodos terapéuticos. En este trabajo presentamos un estudio analítico de 46 casos de GB primarios, *IDH* no mutado, en pacientes adultos.

Aunque el tumor puede presentarse a cualquier **edad**, es característico de edades adultas, entre la quinta y sexta década de vida. La presencia en la edad adulta tardía ha sido relacionada con la acumulación de lesiones genéticas que desemboquen en la formación del tumor. La edad de los pacientes se presenta como un factor pronóstico independiente y significativo relacionado con la evolución y la supervivencia ^{221,249}. En nuestro estudio, la edad al momento de diagnóstico se presentó en la quinta y la sexta década de vida en el 69% de los casos.

En cuanto al **sexo** de los pacientes, se presenta preferentemente en hombres. Las diferentes series analizadas muestran un 60 % de casos en varones frente a un 40% en mujeres ²²¹. En los casos de este trabajo también se detectó la prevalencia de hombres sobre mujeres, algo mayor que el publicado en la literatura.

El estado y discapacidad funcional del paciente fue evaluado mediante el **IK**. Este indicador clínico asociado con factores pronósticos, es una

variable predictiva robusta independiente de la edad del paciente ^{133, 290}. Los resultados de nuestra serie de pacientes, presentaron un IK de 70 o menor, en más del 50% de ellos, y fue un factor estadísticamente significativo, entre los grupos de *EGFR*.

El **síntoma inicial**, fue la HTIC, en más del 50% de los pacientes, seguido de los déficits neurológicos. La duración del síntoma inicial no mostro variación con los datos publicados ^{154,190}.

El **tamaño del tumor** ha sido propuesto por diferentes autores como un factor pronóstico ^{190, 191}. En nuestros casos, el tamaño del tumor fue mayor en los casos que presentaban amplificación de *EGFR*.

Respecto a la **localización**, los GBs, muestran preferencia supratentorial, con una incidencia similar en ambos hemisferios cerebrales. Los trabajos publicados evidencian que los lóbulos frontales seguidos de los lóbulos temporales, y parietales son las localizaciones más frecuente ^{26, 190}. En este estudio las localizaciones fueron coherentes con los distintos registros, no obstante, predominó la localización temporo-parietal. Fue minoritaria la localización en el lóbulo occipital y excepcionalmente en el cuerpo calloso.

En referencia al **tratamiento**, el GB muchas veces muestra elevada resistencia a los diferentes regímenes terapéuticos. Los tres tipos de tratamiento (cirugía, radioterapia y quimioterapia) usados comúnmente en el tratamiento de otras neoplasias, también son utilizados como estrategias terapéuticas del GB ²⁶⁸. La naturaleza difusa e infiltrante junto a las localizaciones anatómicas con áreas críticas y vitales impiden alcanzar resecciones completas ¹¹⁵. Todos los pacientes analizados fueron sometidos a resecciones quirúrgicas en las que se extirpó el tumor, y posteriormente se aplicó quimioterapia o radioterapia, o una combinación de ambas.

Los pacientes con GB presentan una perspectiva de **supervivencia** corta que muchas veces no sobrepasa los 12 meses desde su diagnóstico ²⁵⁸. Algunos estudios publicados mostraron que el 3-5% de los pacientes sobrevivieron durante más de 3 años y se conocen como supervivientes a largo plazo ¹⁵⁹. Los factores clínicos y moleculares que contribuyen a este hecho son todavía desconocidos ²²¹. De los casos estudiados en nuestro trabajo, el tiempo medio de supervivencia fue menor de 12 meses, aunque fue mayor de 12 meses en aproximadamente un tercio de los casos. En tres pacientes se alcanzó una supervivencia mayor de 30 meses. Las características de este trabajo no permite establecer criterios comparativos con estudios reglados (ensayos clínicos) orientados a determinar factores terapéuticos asociados a la supervivencia.

El GB es considerado por la OMS como una neoplasia glial astrocítica con el mayor grado de agresividad (grado IV) ^{190,191}. Es una neoplasia con una gran heterogeneidad tanto intratumoral como intertumoral, que viene definida por la variabilidad de sus poblaciones celulares, con diferentes patrones morfológicos de diferenciación y anaplasia. La clasificación de la OMS del 2007 recoge una división clásica de los GB en primarios o “de novo”, en pacientes sin antecedentes clínicos de neoformación glial astrocitaria y los glioblastomas secundarios, en pacientes con diagnóstico previo de tumor glial astrocitario. Esta división es recogida en esta clasificación con una propuesta de perfil genético ligando el GB primario a la amplificación de *EGFR* y el GB secundario a la mutación en *TP53*. La detección de mutaciones en *IDH* como una característica de los astrocitomas que permite establecer diagnóstico diferencial con el oligodendroglioma, se mostró como criterio diferencial en los GB, para establecer criterios de diferenciación entre los GB primarios, *IDH* no mutado y los GB secundarios

IDH mutado. Esta división es recogida en la clasificación de la OMS de 2016 ¹⁹¹. En nuestro trabajo todos los casos estudiados fueron GB primarios clínicamente, *IDH* no mutado.

Diferentes trabajos han centrado la atención sobre el patrón morfológico de las células neoplásicas con distintas denominaciones ^{117, 230, 302, 307}. En nuestro estudio, en más del 50% de los tumores estudiados la población predominante mantenía el patrón astrocitario. Todos los casos de GB analizados mostraron una angiogénesis displásica con un crecimiento anómalo de los vasos, formando patrones pseudoglomerulares. Junto a esta, la necrosis, en áreas extensas o en pequeños focos de necrosis con organización de las células en pseudoempalizadas, apareciendo relacionados con frecuencia con vasos sanguíneos trombosados. Estas características son considerados criterios diagnósticos necesarios del GB ^{190,191}.

El GB es una neoplasia con **características infiltrantes** siendo uno de los criterios de agresividad más importantes. Se reconocen diferentes patrones de infiltración, que diferencian la agresividad en esta neoplasia, y la dificultad en los planteamientos de resección quirúrgica ⁵⁷. Desde el punto de vista neuropatológico, este tumor puede presentarse con un patrón de infiltración nodular y difuso^{5,335}. El patrón nodular, definido radiológicamente por sus límites definidos, e histopatológicamente por la definición de un límite del tumor con alta densidad celular frente al tejido nervioso. El patrón difuso viene caracterizado por la no delimitación en la imagen radiológica del tumor, e histopatológicamente por un patrón sin límites definidos del mismo ⁵⁷. En nuestros casos, en los que fue posible observar el patrón de infiltración, un poco más del doble de casos fue difuso, y se asoció con los casos que presentaban amplificación de *EGFR*.

El estudio inmunohistoquímico realizado se orientó hacia la caracterización diagnóstica del GB, el índice proliferativo, y el estudio de la expresión de EGFR y p53.

La expresión de GFAP, fue positiva en el citoplasma de las células neoplásicas en todos los tumores estudiados, confirmando su diferenciación, preferentemente astrocitaria, dato ampliamente referido en la bibliografía ^{68, 141, 286}. Por otra parte, la expresión positiva en los endotelios de CD34, se utilizó como un marcador descriptivo de la hiperplasia vascular, el carácter displásico y los patrones pseudoglomerulares de su crecimiento ⁸⁸.

El Ki67, es el marcador de proliferación más ampliamente utilizado para medir el índice de proliferación y para poder tener una estimación del crecimiento cuantitativo de una neoplasia, hasta el punto de actuar con frecuencia como una variable pronóstica ^{135, 288}. En glioblastomas, los índices de Ki-67 son elevados, oscilando entre el 15-20% ¹⁴⁸. En nuestros casos este índice fue heterogéneo, pero fue mayor de manera estadísticamente significativa en el grupo H-amp, hecho que indicaría mayor agresividad en los casos de este grupo.

La expresión de p53 fue muy heterogénea tanto entre tumores como en diferentes áreas del propio tumor, comportamiento similar al descrito en la bibliografía ^{134, 139}. Y con respecto a la expresión inmunohistoquímica de EGFR, se observó estadísticamente significativa con respecto a la amplificación del gen, hecho que detallaremos más ampliamente.

5.2 Caracterización genética. Amplificación de *EGFR* y vías de señalización

El glioblastoma presenta un patrón altamente heterogéneo tanto a nivel histopatológico como genético, siendo la amplificación de *EGFR* la

alteración más frecuentemente implicada, que se detecta entre el 40-70% de los casos estudiados, principalmente en los llamados GB primarios^{187, 221}.

El FISH es una metodología que utiliza sondas de DNA para detectar o confirmar anomalías génicas o cromosómicas que generalmente están más allá de la capacidad de resolución de la citogenética de rutina. Con esta metodología es posible conocer el estado de amplificación de *EGFR* en los tumores. En el caso del GB las secuencias amplificadas se han encontrado localizadas en dmin, aunque por FISH hay pocos trabajos realizados sobre metafases¹⁸⁷; sin embargo, estudios de FISH en núcleos interfásicos son más frecuentes, observándose una considerable heterogeneidad en el número de copias de *EGFR*^{170,186}. Estudios realizados simultáneamente en metafases y en núcleos de GB han demostrado que, según el número de copias y el tipo de amplificación, se presentan casos con un alto nivel de amplificación en forma de dmin y casos con bajo nivel de amplificación en forma de inserciones cromosómicas en el cromosoma 7^{186,187}, considerándose el grupo de baja amplificación como un paso previo en la aparición de esta alteración molecular¹⁸⁷.

En este contexto, los tumores de este estudio han sido agrupados según el estatus de amplificación de *EGFR* en tres subgrupos: GB altamente amplificado (H-amp), GB con baja amplificación (L-amp) y GB no amplificado (N-amp). Destacan como criterios diferenciales: el nivel de amplificación, el mecanismo de amplificación (dmin versus inserción génica) y la distinta frecuencia de afectación de las poblaciones celulares.

Los resultados obtenidos por FISH fueron parcialmente validados por PCR diferencial. Los resultados obtenidos por esta técnica revelaron amplificación de *EGFR* sólo en los casos correspondientes a los casos del grupo H-amp, identificado por FISH. Un caso de este grupo fue detectado como no amplificado por PCR, dado que presentó una amplificación con un

alto número de copias, pero sólo en un bajo porcentaje de las células analizadas. Estos resultados son similares a otros estudios donde se comprobó que técnicas como la PCR diferencial o SNPs arrays, son técnicas que tienen menos probabilidad de detectar niveles de amplificación presentes en pequeñas poblaciones celulares tumorales ^{187, 207}.

La amplificación de *EGFR* se ha observado asociada con el aumento en el número de copias del cromosoma 7. Sin embargo, se ha identificado tanto en GB con amplificación de *EGFR* como en GB sin amplificación, por lo que esta anomalía cromosómica se consideraría un evento inicial en la tumorigénesis del glioblastoma ^{27, 206, 240}. Todos nuestros casos presentaron trisomías o polisomías del cromosoma 7.

Existe una relación muy directa entre la amplificación del *EGFR* por FISH y la sobreexpresión de la proteína por inmunohistoquímica. De manera general, todas las publicaciones han identificado el FISH y la inmunohistoquímica como dos técnicas compatibles para reconocer el estado de amplificación de *EGFR* en GB ^{185, 255}. En nuestro estudio los casos correspondientes al grupo H-amp también presentaron sobreexpresión de la proteína (considerando como sobreexpresión los niveles 2/3 de inmunohistoquímica); los casos del grupo L-amp presentaron expresión variable de la proteína, lo que podría indicar que en este grupo hay casos que se sitúan más cercanos a los del grupo H-amp y otros más cercanos a los del grupo N-amp. En el grupo N-amp, todos los casos, excepto tres, no presentaron sobreexpresión de la proteína, resultado que sigue la línea de otros estudios ^{198, 255, 294}.

Diferentes estudios genéticos en el GB, han modificado el enfoque, de “GB primario” ligado a la amplificación de *EGFR* y “GB secundario” ligado a mutaciones en *TP53*. Un enfoque basado en datos aportados por los

análisis genómicos integrados realizados por el “Cancer Genome Atlas Research Network” ha planteado la consideración de cuatro subtipos de GB: “Proneural”, “Neural”, “Clásico” y “Mesenquimal”^{279,280,281}. En este enfoque, el “GB clásico” muestra las alteraciones de *EGFR* (amplificación y mutaciones) como característica diferencial. Pero esta alteración, también se observa de forma importante en los otros subgrupos de GB, reafirmando las alteraciones en *EGFR* como la más frecuente en estos tumores.

Además de las alteraciones del *EGFR* en el GB, muchas más alteraciones genéticas se han detectado en este tumor lo que denota una gran heterogeneidad en las poblaciones celulares que lo compone. Los métodos convencionales de estudios de genes como puede ser el FISH, PCR, CGH, son técnicas de estudio en las neoplasias que presentan como inconvenientes el alto coste y muchas veces la preparación especial del tejido. Además estas técnicas no detectan algunas alteraciones como por ejemplo mutaciones de las regiones no codificantes^{78,200}. Por otra parte, otras técnicas como las distintas tecnologías de secuenciación masiva de nueva generación, que son capaces de realizar muchas operaciones de secuenciación, están aportando una gran cantidad de datos, pero aún requieren una gran inversión²¹². Frente a este escenario, la MLPA permite hacer un cribado de una alta cantidad de secuencias genómicas definidas, para amplificaciones, deleciones y metilación de promotores en un solo paso, siendo un método de bajo coste y fiable^{28,136,201,269,303}.

El gen *EGFR* fue el más importante a evaluar dentro de los genes de este estudio mediante MLPA. Con esta metodología se pudo constatar la presencia de alta amplificación del gen en todos los casos del grupo H-amp, con excepción del caso 20 que pudo observarse alta amplificación solo en el exón 2, y una baja amplificación en el resto de exones. Este caso es el que

presentaba por FISH, alta amplificación del gen, pero en una población celular muy minoritaria. Mediante el estudio con MLPA no se pudieron diferenciar los grupos L-amp y N-amp, debido a que las trisomías y polisomías del cromosoma 7, dan un aumento en el número de copias, y por lo tanto no distinguible de los casos con baja amplificación de *EGFR*.

Además de la amplificación, también es frecuente encontrar mutaciones, especialmente la variante *EGFRvIII*, que afecta generalmente hasta el 67% de los GBs con *EGFR* amplificado^{83,174,280,297}. En nuestro estudio la presencia de esta variante se detectó en la mitad de los casos, todos ellas en el grupo con un alto grado de amplificación de *EGFR* (grupo H-amp).

Las alteraciones en forma de amplificación de *EGFR* o mutación del gen se vinculan con la desregulación de algunas de las vías de señalización importantes relacionadas con este gen. Este hecho se asocia con un mal pronóstico, pues son vías de transducción de señales que regulan la proliferación celular^{127,129}. Estas vías están alteradas en el GB, especialmente a nivel de genes como *PTEN*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *MDM2*, *CDK4* y *TP53* entre otros²⁹⁷.

La vía *EGFR/RAS/NF1/PTEN/PI3K* presentó alteración en el 74% de los casos (incluyendo el *EGFR* y el *PTEN* que son los dos genes estudiados en esta vía). Esta observación es acorde a otros estudios que señalan entre 50-88%^{227, 242, 279, 280, 281}. Las ganancias y pérdidas de dosis génicas en *EGFR* y *PTEN* son eventos bien conocidos en los GBs y actualmente son objeto de intervenciones terapéuticas^{174, 203}. El *PTEN* se localiza en el cromosoma 10q y es uno de los genes asociados a la malignidad tumoral, su función es la desfosforilación de sustratos¹⁷⁴. En GBs interviene en la vía *PI3K-AKT-mTOR* bloqueando la señal de PI3K, regulando la proliferación celular. En

los GBs primarios, el gen *PTEN* está mutado en el 15%-40% de los tumores^{279, 280, 297}. En nuestro estudio la delección de *PTEN* se presentó en el 47% de los casos en los grupos con amplificación de *EGFR*, y solo en el 25% de los casos sin amplificación. Las alteraciones en este gen sumado a la amplificación de *EGFR* son indicadores de una evolución desfavorable³¹⁶.

En la vía *TP53/MDM2/MDM4/p14ARF*, donde se han estudiado los genes *TP53* y *MDM2*, se produjeron alteraciones en el 37% de los casos. La incidencia publicada es mayor, oscila entre 68-87%, debido a que estos datos incluyen todos los genes de la vía^{227, 242, 279, 280, 297}. En los grupos H-amp y N-amp la frecuencia de las alteraciones fue similar y superior a las presentadas en el grupo L-amp, pero las alteraciones fueron diferentes según el gen implicado, estando más afectado *TP53* en el grupo N-amp, y *MDM2* en el grupo H-amp.

El gen *TP53* se alteró o bien con pérdida en el número de copias o con mutación. La mutación de *TP53* se ha observado en un porcentaje variable de GBs, entre el 2-31% siendo mucho más frecuentes en GBs secundarios que en primarios^{15,59,138}. En cuanto al tipo de mutación, es muy común encontrar sustituciones o transiciones (GC→AT). En nuestros casos, el 4% presentó la mutación, porcentaje bajo pero acorde, ya que todos nuestros casos fueron GBs primarios. Las mutaciones fueron sustituciones como timina por citosina o, al contrario. Este hecho coincide con los datos de la bibliografía, donde se observa que estas mutaciones son las predominantes²²¹.

En el gen *MDM2* se observaron delecciones parciales en heterocigosis y homocigosis y amplificaciones, concentrándose en el grupo H-amp, lo que resultó ser estadísticamente significativo en relación a la supervivencia, ya que ese grupo mostró los datos más bajo de supervivencia. Se ha observado que la sobreexpresión de *MDM2* con o sin amplificación génica

constituye un mecanismo molecular de escape de control de crecimiento regulado por *TP53*, operativo en la evolución de los glioblastomas primarios que normalmente carecen de mutaciones de *TP53*^{25,103}.

Alteraciones en esta vía conllevan a la supresión de la apoptosis, interrupción del ciclo celular, incapacidad de diferenciación celular y elevada inestabilidad genómica por errores en la reparación del DNA²⁹⁹.

En la vía *p16INK4a/CDK4/RB1*, donde se han estudiado los genes *CDKN2A/CDKN2B* y *CDK4*, se observaron alteraciones en el 61% de los casos, coincidiendo con las frecuencias publicadas^{227, 242, 279, 280}. En el grupo H-amp esta vía estaba afectada casi el doble que en los otros dos grupos; y cuando estos dos genes se alteraron simultáneamente, todos los casos observados pertenecían al grupo H-amp.

Las alteraciones en los genes *CDKN2A* y *CDKN2B* localizados en el cromosoma 9p16 son factores de riesgo para la gliomagénesis^{253,317}. En otros tumores cerebrales, estos genes se encuentran alterados de forma recurrente y asociados a la progresión tumoral^{32,318}. Su inactivación lleva a la desregulación en la progresión del ciclo (por la inactivación del punto de control de la fase G1/S) posiblemente en conjunción con la activación de las telomerasas. En nuestro estudio el gen *CDKN2A* y *CDKN2B* se encontró alterado en el 52% y en el 50% de los casos respectivamente, predominado la delección en homocigosis, siendo más frecuente en los grupos con algún tipo de amplificación de *EGFR*.

La convergencia de amplificación de *EGFR* y delección en los genes *CDKN2A* y *CDKN2B*, podría proporcionar una explicación cooperativa de mayor agresividad. Esta confluencia se observa en aproximadamente el 20% de los GBs¹¹². En nuestros casos esta simultaneidad de alteraciones se observó en un porcentaje mayor, alrededor del 38% de los casos. Se observó que en los casos donde convergían ambas alteraciones, fue donde se observó

más presencia de casos con patrón infiltrativo de tipo difuso. Este patrón tendría un mayor problema para la resección quirúrgica y por lo tanto estaría relacionado con una mayor agresividad

La principal función de esta vía es la de actuar como transductor de señales regulando el ciclo celular y la transcripción que media el avance en la proliferación celular ⁸⁶.

La alteración de una vía molecular está asociada significativamente con una de las otras dos. Se ha observado que la desregulación de dos vías es crítica en la patogénesis del GB, y se ha publicado que puede ocurrir en un 77% de los casos ¹²⁷. En nuestro estudio, y con los seis genes estudiados, podemos observar que hay una alteración en al menos dos vías en el 70% de los casos y alteraciones de las tres vías en el 17% de los casos. Esta discordancia con los datos mencionados en la bibliografía, estaría relacionado por el sesgo provocado al analizar solo dos genes por vía. Por otra parte, las tres vías alteradas se encontraron fundamentalmente en el grupo H-amp, no encontrándose ningún caso en el grupo N-amp, lo que indicaría una mayor agresividad de los GBs con alto nivel de amplificación de *EGFR*.

El estudio con MLPA también nos ha permitido establecer perfiles genéticos de los diferentes grupos, según el estatus de amplificación de *EGFR*. A este respecto, los genes *CDKN2A/2B*, *GSTP1* y *CDH1*, relacionados con crecimiento, proliferación celular, apoptosis, y migración, se presentaron alterados en al menos un 30% de los casos de los tres grupos, lo que podría indicar una participación temprana en el desarrollo del GB.

Hay que destacar que *CDKN2A/2B* apareció con una frecuencia doble en el grupo H-amp que, en los otros dos grupos, frecuencia estadísticamente significativa.

Por otra parte, en los grupos con algún tipo de amplificación se observaron genes alterados como *PTEN*, *SAMHD1*, *VHL*, *CREM*, y *LARGE* (Apéndice IV), que no se presentaron con esta frecuencia en los casos del grupo N-amp. Estos resultados podrían indicar perfiles genéticos distintos entre los casos con amplificación y sin amplificación de *EGFR*, y una implicación diferente en la progresión tumoral. Además, los dos grupos con amplificación también presentaron genes distintos alterados con diferentes frecuencias, como el *MDM2* en el grupo H-amp, y el *PAH* en el grupo L-amp, éste último con una frecuencia de alteración estadísticamente significativa. A su vez, en el grupo N-amp, el gen *TP53*, es el que apareció con mayor frecuencia; gen relacionado con los glioblastomas secundarios, *IDH* mutado. Estos resultados indicarían, que los tres grupos podrían tener implicaciones diferentes dentro de la biopatología del glioblastoma (Tabla 58). Un análisis con técnicas genéticas de alto rendimiento podría precisar esta hipótesis.

Tabla 58. Genes implicados en los grupos del glioblastoma según el nivel de amplificación de *EGFR*.

	Comunes	Diferenciales
H-amp	<i>CDKN2A/2B</i> <i>CHH1</i> <i>GSTP1</i>	<i>PTEN</i> <i>SAMHD1</i> <i>VHL</i> <i>CREM</i> <i>LARGE</i> <i>MDM2</i> <i>MYBPC3</i> <i>OCA2</i>
L-amp	<i>CDKN2A/2B</i> <i>CHH1</i> <i>GSTP1</i>	<i>PTEN</i> <i>SAMHD1</i> <i>VHL</i> <i>CREM</i> <i>LARGE</i> <i>PAH</i> <i>BCL2</i>
N-amp	<i>CDKN2A/2B</i> <i>CHH1</i> <i>GSTP1</i>	<i>TP53</i>

Mediante la técnica de MLPA hemos podido conocer el estatus de metilación de los genes estudiados. Con respecto a este análisis, observamos que la hipermetilación fue baja, siendo *RASFF1* el gen más hipermetilado en los tres grupos de estudio, seguido del gen *CASP8*, más hipermetilado en los grupos L-amp y N-amp. El gen *RASSF1* interviene en la reparación del DNA, la detención del ciclo celular y se encuentra metilado en múltiples tipos tumorales ^{35, 63}. La metilación de este gen se ha asociado con la tumorigénesis en el GB ^{116, 119}. El gen *CASP8* desempeña un papel central en el proceso de apoptosis celular. La hipermetilación de la *CASP8* pro-apoptótica es una característica diferencial de las recaídas de los GBs y se asocia con pacientes de corta supervivencia ^{199,263}.

La elevada acumulación de alteraciones y aberraciones en los casos estudiados de glioblastoma, nos indica la elevada inestabilidad genómica de este tumor. Algunos de los genes alterados detectados en este estudio son aberraciones características y recurrentes en la panorámica genómica del GB, y hemos observado una mayor incidencia en el grupo con alta amplificación de *EGFR*. Su elevada frecuencia evidencia que los genes contenidos son clave, y están directamente relacionados e implicados en la génesis, y progresión del GB ¹⁹⁴.

5.3 Estudio de la expresión de miRNAs en GB

En la actualidad se viene desarrollando nuevas formas de intento de clasificación de tumores basada en técnicas para el estudio de los perfiles de expresión génica mediante arrays. Algunos autores han utilizado estas técnicas tanto para distinguir la expresión de genes entre glioblastomas y astrocitomas de menor grado como para identificar subclases distintas de GBs ^{158,183,194,213}.

Dado que la alteración en la expresión de los miRNAs parece ser una característica general del cáncer, varios estudios han investigado si están diferencialmente expresados en los tumores del SNC. Se ha observado que el 30% de los miRNAs evaluados se hallan desregulados en dos o más estudios independientes; estos perfiles podrían ser útiles como biomarcadores ^{12,40}. También es importante destacar que los perfiles de expresión de miRNAs obtenidos por la TCGA ^{279,280,281} han permitido la identificación de subgrupos de GB según su origen, lo que ha servido para apoyar clasificaciones previas, pero a la vez han revelado heterogeneidad dentro de esas clasificaciones ^{153,297}.

En nuestro trabajo, hemos tratado de identificar perfiles de expresión de miRNA que diferencien los tres grupos de glioblastomas según el grado de amplificación de *EGFR*. De los 64 miRNAs identificados como significativos, el 20% de ellos, se encontraron localizados en cromosomas con gran inestabilidad genética en este tumor, como son el 1, 7, 9, 10 y el 22, hecho que podría estar relacionado con su desregulación. De ellos se identificaron como infraexpresados el 70%, y como sobreexpresados el 30% ²⁵⁰. Todos los miRNAs, a excepción de uno, identificados como más significativos entre los grupos de estudio se presentaron infraexpresados. Hipotéticamente, un miRNA que es infrarregulado en el cáncer y tiene como diana un oncogén, podría actuar como supresor tumoral, mientras que una sobrerregulación de un miRNA que tenga como diana un supresor tumoral o un gen importante para la diferenciación, podría actuar como un oncogén ⁴².

Dentro de las vías de señalización más importantes relacionadas con *EGFR*, los miRNAs identificados en nuestro estudio por orden de significancia fueron: miR-200c, miR-129, miR-124, miR-128, miR-382,

miR-383 y miR-219-2-3p. Todos ellos se presentaron infraexpresados y han supuesto el 64% de los miRNAs estadísticamente significativos.

El **miR-200c**, pertenece a la familia miR-200 junto a otros cuatro miembros: miR-200a, miR-200b, miR-429 y miR-141¹⁵⁷. El análisis funcional en diferentes bases de datos, utilizando el programa “Pathway studio”, muestra que este micro presenta una implicación en diferentes procesos celulares, así como asociación a vías de señalización dependientes de *EGFR*. Mediante este programa bioinformático, miR-200c tiene una acción reguladora negativa sobre algunos de estos procesos y vías de señalización como *PI3K/AKT*, *MAPK /ERK1/2*, *AKT/NFκB*. Estas vías están implicadas en activación de genes que intervienen en diferentes procesos neoplásicos (apoptosis, proliferación celular y migración) y /o mecanismos de estrés oxidativo entre otros ¹²⁷.

En el análisis funcional realizado según las bases de datos se observó que *TP53* es un regulador positivo de miR-200c, inhibiendo a *PDGFR*. Una consecuencia importante de la pérdida de actividad de *TP53* es el aumento de la inestabilidad genética manifestada por la desregulación de determinados genes o por la ausencia de reparación de daños en DNA ²⁴⁰.

El **miR-129** regula importantes dianas moleculares de las vías alteradas en GB como PDGFRA de la vía *EGFR/PTEN/PI3K*, o indirectamente mediante HMGB1 que interactúa con *TP53* en la vía *TP53/MDM2/4/P14* ^{323, 324}.

EL **miR-124** es el más expresado en el cerebro. Su desregulación afecta el espectro de funciones biológicas del SNC. Recientemente, el vínculo entre la desregulación de miR-124 y los trastornos del SNC, tales como la neurodegeneración, enfermedades neuroinmunes, y tumores cerebrales, han llegado a ser evidentes ²⁷³.

Este miRNA, está relacionado con la vía *p16/CDK4/RB* bloqueando directamente a CDK4. Se ha visto que la sobreexpresión de CDK4 se traduce en un peor pronóstico y confiere en gliomas resistencia a la radioterapia ⁶⁴.

El **miR-128** es otro de los miRNAs más expresados en cerebro y muestra baja regulación en los gliomas ^{55,95,332}. Sin embargo, no se conoce con exactitud el papel que tiene en la carcinogénesis y en el desarrollo de estos tumores. Se ha observado que bloquea la fase G1/S en GB y reprime el crecimiento, regulando a EGFR y PDGFR α en células madres de GM, implicados en la vía *EGFR/RAS/PI3K* ²²⁴. Se ha descrito en 2012 un resultado novedoso que ayuda a esclarecer el rol de este miRNA. Se observó que miR-128 actúa como un supresor tumoral regulando directamente a p70S6K1, HIF1 α y VEGF, directamente implicados con la carcinogénesis, los procesos de metástasis y angiogénesis del GB, tanto *in vitro* como *in vivo* ²⁵⁴.

Del miR-382, no hemos encontrado información en glioblastomas. Los estudios en tumores gástricos y hepáticos han demostrado que la sobreexpresión de miR-382 sobrerregula la vía *PTEN/AKT/mTOR*, lo que indica que *PTEN* es un gen diana funcional de miR-382. Además, *PTEN* inhibe a miR-382 lo que induce la angiogénesis *in vivo*, así como la secreción de *VEGF*. Estos resultados sugieren que miR-382 inducido por hipoxia promueve la angiogénesis y actúa como un oncogén angiogénico por la represión de *PTEN* ^{18,251}.

El **miR-383** se encuentra infraexpresado en gliomas, lo que se asocia a una mayor progresión tumoral; por el contrario, los niveles elevados de expresión de este miRNA pueden activar la vía *AKT* por sobrerregulación de *MMP2* y *IGF1R* ¹¹¹.

Y, por último, el **miR- 219-2-3p**, no ha sido estudiado en GBs, pero si su homologo el miR-219-5p. Se ha observado en una larga serie de estos

tumores, que el miR-219-5p reprime EGFR. En todos los casos se observó la infraexpresión de miR-219-5p. Además, este miRNA, inhibe las vías *MAPK* y *EGFR/PTEN/PI3K* en las líneas celulares de glioma, en concordancia con su capacidad de regular a EGFR²⁴¹. Por lo tanto, un estudio de su homólogo miR.219-2-3p podría tener una implicación similar dado que muchos integrantes de un mismo cluster actúan en sinergia para lograr regular una vía de señalización.

Algunos de los miRNAs significativos en este estudio están implicados en el **proceso de migración celular**. Por orden de significancia fueron: miR-200c, miR-138, miR-891a, miR-129-5p, miR-124, miR-382, miR-383, y miR-219. Todos ellos se presentaron infraexpresados, y representaron el 66% de los miRNAs significativos.

La familia **miR-200** juega un papel importante en la EMT, y por ello en los procesos de migración celular. Y, dado que el miR-200c fue el más capaz de diferenciar claramente entre los grupos de casos según el estatus de amplificación de *EGFR*, lo veremos más detalladamente en un apartado posterior, analizando su comportamiento en el modelo experimental.

La infraexpresión **del miR-138** ha sido frecuentemente observada en varios tipos de cáncer. El miR-138 está relacionado con la iniciación del crecimiento y la supervivencia de las células madres de GB potenciando su auto-renovación. La inhibición funcional específica de la secuencia de miR-138 impide la formación de neuroesferas *in vitro* e impide la tumorigénesis *in vivo*⁴⁸. Se sabe que actúa como un supresor tumoral implicado en la invasión de las células de GB suprimiendo la proliferación *in vitro* y la tumorigenicidad *in vivo*^{238,266}. Se ha identificado que HIF-1a es su diana molecular. En cultivos celulares, miR-138 puede regular negativamente la expresión de HIF-1a; regula la expresión de dianas moleculares implicadas en el crecimiento y la diferenciación celular³¹⁴.

El **miR-891a** está poco estudiado en GBs, encontrándose sobreexpresado en los perfiles de miRNA de una corta serie de estos tumores comparados con tejido normal de corteza cerebral, pero no de manera significativa²⁶². En el cáncer de próstata este miRNA está sobreexpresado y actúa in vitro como promotor de la proliferación celular, la formación de colonias, la migración e invasión¹⁰⁶. Y de manera general, una sobreexpresión de este miRNA aumenta la migración celular en carcinomas³²⁸.

El **miR-129-5p** no hay referencias de su papel en la migración de las células del GB. Recientemente, se ha publicado que el miR-129-5p regula la migración y la invasión en células de cáncer gástrico teniendo como diana a la interleuquina-8. La transfección con inhibidor de miR-129-5p, aumentó notablemente la viabilidad celular, la capacidad de formación de colonias, y el número de células que migraron. La IL-8 fue regulada negativamente por el miR-129-5p. La co-transfección de inhibidor de miR-129-5p con si-IL-8 invirtió el efecto inhibidor de miR-129-5p sobre la migración y la invasión de las células¹³⁷.

El **miR-124** inhibe la migración de células de glioma y la invasión mediante la regulación de ROCK1, relacionado con la movilidad celular⁷.

Del **miR-382** no hay referencias de su papel en la migración de las células del GB. En otros tumores como en cáncer gástrico, renal, colorectal y en cáncer de ovario se ha observado que mediante la activación de TGF-1 se induce la transición epitelio-mesenquimal, lo que da como resultado un aumento en la migración de las células de estos tipos de neoplasias^{160, 251, 275,}

El **miR-383** cuando presenta los niveles elevados de expresión puede inhibir el crecimiento celular, la invasión y promueven la apoptosis celular, en gliomas ³²¹.

Y, por último, el **miR- 219-2-3p**, aparece referenciado en un estudio de transfección en líneas celulares de glioma, donde este miRNA se sobreexpresó, observándose la inhibición de la proliferación, y la migración celular ²⁴¹.

5.4 Análisis del papel del miR-200c en el glioblastoma

En la evolución del GB, se detectan cambios en su patrón infiltrativo ligados a modificaciones en el comportamiento migratorio de las células neoplásicas. Estos cambios, ya conocidos en otras neoplasias como “Transición Epitelio/Mesenquimal (EMT), afectan a procesos de reconocimiento, unión intercelular y capacidad de movimiento, entre otros; y están asociados a modificaciones genéticas y epigenéticas de las células neoplásicas ^{57, 179,335}.

Estos procesos son conocidos en el GB como “Modo Mesenquimal de Migración e Invasión” (MMMI) y aparecen asociados a cambios en la expresión de distintas proteínas de unión, de reconocimiento de membrana, de interacción con el intersticio, entre otras. Estos cambios, con frecuencia, están directamente relacionados con una alteración en la función génica y en las vías de señalización específicamente ligadas a estos procesos ^{57,335}.

El papel del miRNA-200c está descrito en diferentes tumores epiteliales, y la pérdida de su expresión se asocia con la progresión de la enfermedad en diferentes neoplasias, incluyendo cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón y cáncer de ovario^{1,30,197}. Este miRNA está implicado en el proceso EMT; su acción, entre otras, es modular la expresión

de ZEB1 y ZEB2 que actúan como “represores transcripcionales” de la E-Cadherina (CDH1), por lo que a través de este sistema se reduciría la movilidad celular y la capacidad de migración e infiltración neoplásica^{20, 226}.

En estudios realizados en tumores primitivos de cáncer de ovario se concluyó que la familia miR-200 determina el fenotipo epitelial de las células cancerosas regulando la EMT y la progresión de este tipo tumoral²²⁶. Estos estudios fueron validados en una larga serie de tumores primarios de cáncer de ovario, así como en cultivos celulares, donde se observó una fuerte relación inversa entre la expresión de los miembros de la familia miR-200 y la expresión de ZEB1/ZEB2²⁰. Estos resultados son similares a los descritos en líneas celulares y tumores primarios de cáncer colorectal y de mama, donde se encontró que ZEB1 reprime al promotor de miR-200c, aunque se desconoce la contribución de ZEB2 en esas células³⁹.

Por otra parte, la contribución de la sobreexpresión de EGFR o su activación autocrina en el proceso EMT están aún sin resolver.

En un estudio realizado en tumores primarios de carcinomas y en líneas celulares establecidas, al inhibir la expresión de EGFR se reprimió fuertemente la expresión de ZEB1 y ZEB2. ZEB1 es especialmente crítico para la EMT en carcinomas y se observó que EGFR promueve EMT a través de la regulación de ZEB1, y que el bloqueo de ZEB1 es suficiente para bloquear la EMT inducida por TGF- β en estos tumores²¹⁸. En consonancia con los anteriores hallazgos, los inhibidores de EGFR pueden bloquear EMT y suprimir la generación de células madre cancerosas que expresan altos niveles de CD44, por la baja regulación de ZEB1²⁴⁵.

En un estudio realizado en líneas celulares de cáncer de vejiga se logró investigar los mecanismos que subyacen al proceso de EMT y la resistencia inducida a la terapia EGFR-dirigida. Los resultados revelaron una

asociación estrecha y directa entre la expresión de miR-200, E-cadherina, y sensibilidad a los antagonistas de EGFR. También demostraron que ZEB1 y ZEB2 estaban involucrados en el proceso de EMT e identificaron una nueva diana (ERRFI-1/Mig6), que también desempeña un papel importante, porque media la resistencia a EGFR. Estos resultados permiten identificar de forma prospectiva los tumores de vejiga que serán más susceptibles al tratamiento dirigido hacia EGFR¹.

Hasta la fecha, estudios de la implicación del miR-200c en tumores primitivos de GB solo existe el trabajo publicado por nuestro grupo²⁵⁰. Nuestros datos muestran una clara relación entre la amplificación de *EGFR* y la expresión de miR-200c, estadísticamente significativa, en los tumores primitivos de GBs, de manera que, en los casos con alto nivel de amplificación de *EGFR*, mostraron los niveles más bajos de miR-200c. Aunque no hay artículos publicados de este miRNA relacionado con EGFR en tumores primitivos de GBs, en la base de datos “The Cancer Genome Atlas (TCGA)”^{279, 280, 281} encontramos, que la expresión de miR-200c mostró una disminución estadísticamente significativa en muestras con amplificación de *EGFR*.

También se encontró que la expresión ZEB1 también mostró un aumento estadísticamente significativo en las muestras con amplificación de *EGFR*^{46,276} en correspondencia con lo obtenido en el grupo H-amp de nuestro estudio, donde los casos con alta amplificación de *EGFR* mostraron los valores más altos de ZEB1.

En los cultivos primarios y en la línea celular de GB estudiada, se corroboraron los resultados obtenidos en tumores primarios, ya que los cultivos con amplificación de *EGFR* presentaron una menor expresión del miR-200c con respecto a los cultivos sin amplificación. En cuanto al ZEB1,

los cultivos amplificadas presentaron mayor expresión que el cultivo no amplificado.

Dentro del proceso de la EMT, se sabe que las caderinas regulan, entre otras funciones, la adhesión celular dentro de los tejidos ¹⁷¹. La baja expresión de caderinas produce un aumento de la motilidad celular, y a su vez permite que las células del tumor puedan invadir los tejidos circundantes, es decir la pérdida de cadherinas va ligada a la migración en las células neoplásicas ^{45,125,168,173}. Nuestro estudio sobre los tumores primitivos de GB mostró una correlación positiva entre el miR-200c y CDH1. Los tumores sin amplificación de *EGFR* o baja amplificación mostraron la más alta expresión de CDH1, estos tumores son los que presentaron de forma preferente un patrón de infiltración nodular. Sin embargo, en nuestros cultivos celulares no se obtuvo expresión de CDH1.

Debido al origen de los astrocitos, el concepto de la EMT no es totalmente trasladable a los glioblastomas, ya que estos tumores expresan niveles muy bajos de E-cadherina, o está ausente ^{178, 292}. No obstante, la expresión de ZEB1 se ha observado en células de GB debido a otros intermediarios como la Wnt/ β -catenina, que aumenta la motilidad celular y actúa de manera similar en la transición epitelio-mesenquimal ¹⁴³. También puede explicarse la regulación de mir-200c/Zeb1 a través de la vía de señalización FAK/Src. Esta vía está estudiada en gliomas, donde en los márgenes invasivos del tumor primario se expresan elevados niveles de FAK ^{327,335}. El Src es un proto-oncogén que interacciona con FAK, la interacción de ambos es un importante determinante de la migración de células mesenquimales ^{291, 335}.

Debido a la escasez de estudios relacionando el estatus del *EGFR* y el miR-200c, son muchos los interrogantes que se plantean sobre si la

activación de EGFR interfiere con la EMT y si tales interacciones alteran el potencial migratorio e infiltrativo de las células, así como su sensibilidad a la radioterapia y a otros tratamientos.

5.5 Estudio del comportamiento del miR-200c en glioblastoma mediante transfección en cultivos celulares

Se han desarrollado diferentes procedimientos de gran utilidad en los estudios de biología molecular y celular, con el propósito de poder introducir moléculas en el interior de la célula, superando su barrera natural; entre los que podemos citar las técnicas de transfección celular. La elección del método o técnica depende en gran medida del objetivo final del experimento y de la disponibilidad del presupuesto y del equipamiento adecuado.

En este sentido, las ventajas del método de transfección de miRNAs o RNAi mediante lipofección, utilizado en este trabajo frente a otros métodos, es la gran efectividad en cultivos celulares, es relativamente simple, rápido y repetible; siendo un método eficaz para la expresión transitoria o temporal¹⁸⁴.

Este método ha sido empleado para estudiar distintas funciones celulares como la apoptosis, la angiogénesis, la migración e invasión, entre otros, modificando la expresión, ya sea por sobreexpresión o inhibición de miRNAs o por sobreexpresión o silenciamiento de RNAi, en diferentes tipos tumorales, como cáncer de pulmón, cáncer de mama^{33, 285}, glioblastoma^{54, 319} entre otros.

La mayoría de los estudios de transfección de miRNAs, han sido realizados sobre líneas celulares establecidas, siendo escasos los trabajos sobre cultivos primarios humanos⁹⁸, hecho que tiene mayor interés, dado la similitud del cultivo primario con el tumor original. En este trabajo, además de dos líneas celulares, hemos utilizado seis cultivos primarios de GB,

ampliamente caracterizados, tanto a nivel morfológico como molecular, y con los diferentes estatus de amplificación de *EGFR* utilizados en este estudio. Además los cultivos primarios presentaban características histopatológicas y genéticas similares a los tumores primitivos correspondientes.

El análisis del comportamiento del miR-200c en cultivos celulares en distintos tipos de tumores mediante sobreexpresión o inhibición del miR-200c o silenciamiento de *EGFR* ha permitido el estudio de sus dianas moleculares y su implicación en la EMT^{257, 270, 333}. En tumores epiteliales, se ha demostrado que **la sobreexpresión** del miR-200c bloquea la expresión de *ZEB1* y *ZEB2*²²⁶. En este sentido, diferentes estudios informan de una regulación recíproca de *ZEB1* sobre miembros de la familia de miR-200c, y viceversa, activando fuertemente la diferenciación epitelial en las células pancreáticas, colorrectal y en cáncer de mama³⁹.

Así mismo, en el estudio de líneas celulares de adenocarcinoma de páncreas (*HPAF2* y *DLD1*) con inhibidores de miR-200c, se observó una transición mesenquimal que se evidenció por la dispersión de células, la regulación positiva de vimentina y la reducción de la expresión de E-cadherina^{39,142}.

En cuanto a la relación miR-200c y *EGFR*, no hay muchos estudios publicados al respecto. Ha sido estudiada en cáncer de tiroides, donde se observó que la pérdida de expresión de miR-200c provocó el aumento de expresión de *EGFR* en las células tumorales³³³. Un estudio sobre la sobreexpresión de miR-200c demostró que dicho aumento recupera parcialmente el comportamiento sensible a *EGFR* de las células de carcinoma pulmonar no microcítico, que son resistente a gefitinib, suprimiendo la activación de las vías dependientes de *EGFR*¹⁸⁰.

En el estudio de nuestros cultivos transfectados, **con sobreexpresión** de miR-200c, fue evidente el bloqueo automático de la expresión del ZEB1 en todos los cultivos estudiados. Sin embargo, en los cultivos **con inhibición** de miR-200c, sólo se observó un aumento de la expresión de ZEB1 en los cultivos sin amplificación. Por otra parte, y en cuanto a la expresión de EGFR, en situación de inhibición del miR-200c, se observó un aumento en la expresión de EGFR sólo en los cultivos sin amplificación. Así mismo, el silenciamiento de EGFR provocó una disminución de la expresión de ZEB1 en todos los cultivos con diferentes niveles, a excepción del cultivo con alto nivel de amplificación que a su vez se correspondía con el mutante *EGFR^{vIII}*.

El miR-200c desempeña un papel crucial en la tumorigénesis y la progresión tumoral, y como consecuencia de su participación en la EMT, actúa como modulador en **la migración celular**, afectando al desarrollo del tumor y a la producción de metástasis. Sin embargo, el papel de miR-200c y el mecanismo por el cual modula la actividad migratoria de los diferentes tipos de cánceres es aún desconocida, solo se han iniciado estudios en algunos de éstos.

En cultivos celulares de cáncer de colon, páncreas y pulmón, la **sobreexpresión de miR-200c** condujo a la reducción de expresión de ZEB1, TGF β 2 y al aumento de los niveles de E-caderina, lo **que redujo considerablemente la migración**, hecho que indicaría un papel inhibitor potencial en la progresión del tumor ^{39,92,142,325}.

Recientemente se ha publicado un estudio que analiza la acción del miR-200c/ZEB1 en los procesos de invasión y metástasis en cáncer de pulmón. Este trabajo, se ha centrado en las interacciones célula-matriz, esenciales para la activación de las células tumorales. Cuando no se expresaba el miR-200, la integrina β 1 interacciona con el colágeno I y se

observaba la migración/invasión *in vitro*, y la metástasis *in vivo* en ratones. ZEB1 mejora la capacidad de respuesta de las células tumorales a la composición de la matriz extracelular y activa la vía de señalización de FAK/Src mediante la represión de una diana directa de miR-200, *CRKL*. *CRKL* actúa como una molécula adaptadora para facilitar la formación de adhesiones focales, que mantienen los contactos célula-matriz. Alteraciones en estas diferenciaciones de membrana potenciarían la invasión celular²⁹¹.

Existen evidencias acerca de un supuesto papel del EGF y su receptor (EGFR) en procesos de invasión, migración y finalmente metástasis, en diferentes tumores como el cáncer de mama o pulmón^{202,310}. En células de cáncer de mama la unión de EGF a su receptor induce diversas vías de señalización como son la activación de la proteína quinasa C-delta, las quinasas activadas por mitógenos, y la fosfolipasa C- γ ; estas vías facilitan la migración celular^{161,284}. También se ha demostrado que la activación de EGFR induce la producción de metaloproteínasa 9, posiblemente a través de la vía de PI3K, que conduce a la migración celular⁷³.

En el caso del GB los trabajos sobre el papel del miR-200c y la migración celular son muy escasos, y solo se han realizado en líneas celulares. Recientemente se ha estudiado la expresión de ZEB1, y parece estar asociada con la infiltración de células tumorales mediante el feedback que se establece entre miR-200c y ZEB1. Se demostró que una sobreexpresión de este miRNA induce la degradación de *ZEB1* y suprime la expresión de esta proteína¹⁰⁰.

En nuestro estudio, la sobreexpresión de miR-200c en las células de cultivo de GB, provocó una inhibición de la migración celular, a excepción del cultivo HC-466, el cual es un cultivo que muestra amplificación de

EGFR y presencia de la variante mutante *EGFRvIII*. Con respecto a la inhibición del miR-200c, se observó un aumento de la migración celular, aunque en tiempos distintos según los cultivos.

Los trabajos publicados sobre el silenciamiento de *EGFR* y migración celular, aportan datos que no han sido concluyentes³³⁰. Al silenciar *EGFR* en dos líneas celulares de GB, con diferente expresión de *EGFR* (U373 MG, LN18), se ha observado que la expresión del mRNA y la proteína se redujo en un 70-90%. Sin embargo, no tuvo efecto inhibitor sobre la proliferación celular y la migración, lo que indicó que la baja regulación específica de *EGFR* no podría ser suficiente como agente único en GB³⁰⁰. Sin embargo, posteriormente se ha demostrado que tratando las células U251 de GB con el silenciador de *EGFR*, se inhibió la expresión de este RNAm, y la inhibición del crecimiento en células in vitro¹⁴⁶.

En nuestro modelo experimental, al silenciar *EGFR* se produjo una disminución de la migración celular. Fue más evidente en los casos sin amplificación de *EGFR*, y en el cultivo con baja amplificación, no observándose en el cultivo con amplificación y mutación de *EGFR*.

Son muchos los interrogantes que hay planteados sobre el proceso de infiltración del glioblastoma, y específicamente del papel de los miRNAs. Mediante el análisis de nuestros resultados, tanto en los tumores primitivos como en el modelo experimental con cultivos celulares, hemos podido definir la implicación del miR-200c en el GB, y la relación con dianas moleculares que podrían estar implicadas en la capacidad infiltrativa de estos tumores. Además, existiría una relación estrecha entre miR-200c y la amplificación de *EGFR* en el proceso de MMMI. Los estudios de miRNAs y sus dianas podrían utilizarse en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de estos tumores.

6. CONCLUSIONES

En el estudio genético y epigenético realizado en tumores primitivos y cultivos celulares de glioblastoma hemos llegado a las siguientes conclusiones:

- 1.- Los tumores fueron clasificados como glioblastoma primario, *IDH* no mutado, siguiendo los criterios de la OMS (2016).
- 2.- El estatus de *EGFR* estudiada mediante FISH, discriminó tres grupos de GB: con alto nivel de amplificación (H-amp), con bajo nivel de amplificación (L-amp), y sin amplificación de *EGFR* (N-amp). Los grupos L-amp y N-amp no se pudieron diferenciar con la técnica de PCR ni con la MLPA, por lo que el FISH fue la técnica de mayor resolución para la observación de los diferentes tipos de amplificación de *EGFR*.
- 3.- Los tumores del grupo H-amp presentaron, de manera estadísticamente significativa, un IK menor, y una expresión mayor de Ki-67 y de EGFR. Además, el patrón de infiltración difuso fue el más frecuente. Todas estas características estarían relacionadas con una mayor agresividad tumoral en este grupo.
- 4.- El estudio con MLPA permitió definir perfiles genéticos diferenciables para los grupos estudiados. Los genes *CDKN2A/2B*, *GSTP1* y *CDH1*, aparecieron alterados en los tres grupos de GB, posiblemente como genes implicados de forma temprana en el desarrollo del tumor. Las alteraciones en *CDKN2A/2B* aparecieron con una frecuencia mayor, estadísticamente significativa, en el grupo H-amp.
- 5.- Los grupos de GB con amplificación de *EGFR* presentaron con mayor frecuencia alteraciones en los genes *PTEN*, *SAMHD1*, *VHL*, *CREM*, y *LARGE*. A su vez, el grupo H-amp mostró con mayor frecuencia alteraciones en *MDM2*, y el grupo L-amp alteraciones en *PAH*, este último estadísticamente significativo. Dentro del grupo N-amp, alteraciones en *TP53*, aparecieron con mayor frecuencia. Estos resultados estarían a favor de mecanismos evolutivos diferentes en la biopatología del GB.

6.- El estudio de los genes implicados en las vías de señalización estudiadas dependientes de *EGFR*, mostraron que alteraciones en estas tres vías simultáneamente se presentaron de forma mayoritaria en el grupo H-amp, no observándose ningún caso en el grupo N-amp. Este hecho indicaría un perfil oncogénico más agresivo de los GB con alta amplificación de *EGFR*.

7.- El estudio de miRNA ha permitido establecer patrones de expresión diferentes entre los grupos de GB. Los niveles de expresión del miR-200c permitieron diferenciar, de manera estadísticamente significativa, el grupo H-amp, frente a los grupos L-amp y N-amp.

8.- La expresión de miR-200c presentó una relación estadísticamente significativa, con la amplificación de *EGFR*, tanto en los tumores como en los cultivos celulares. Los casos del grupo H-amp, mostraron los niveles más bajos de expresión de miR-200c.

9.- Los tumores del grupo H-amp presentaron, de manera estadísticamente significativa, los valores más altos de expresión de ZEB1 y los más bajos de expresión de CDH1. El mismo resultado de ZEB1 se obtuvo en los cultivos celulares, pero no se pudo demostrar expresión de CDH1.

10.- En los cultivos transfectados, con sobreexpresión de miR-200c, fue evidente el bloqueo automático de la expresión de ZEB1 en todos ellos. Sin embargo, en los cultivos con inhibición de miR-200c, sólo se observó un aumento de la expresión de ZEB1 en los cultivos sin amplificación.

11.- El silenciamiento de *EGFR*, en los cultivos transfectados, provocó una disminución de la expresión de ZEB1 en los cultivos celulares, a excepción del cultivo con alto nivel de amplificación de *EGFR*, que a su vez presentaba el mutante *EGFRvIII*.

12.- En el modelo experimental, la sobreexpresión de miR-200c en las células de cultivo de GB, provocó una inhibición de la migración celular, excepto en el cultivo con amplificación de *EGFR* y con la variante mutante *EGFRvIII*. Con respecto a la inhibición del miR-200c, se observó un aumento de la migración celular, en tiempos distintos según los cultivos.

13.- El silenciamiento de EGFR, en el modelo experimental, produjo una disminución de la migración celular. Esta fue evidente en los casos sin amplificación de *EGFR*, y en el cultivo con baja amplificación, no observándose esta disminución, en el cultivo con amplificación y mutación de *EGFR*.

14.- De todos estos resultados obtenidos, se puede deducir que miR-200c actuaría como un regulador potencial de la migración y la invasión a través de ZEB1 en GB. Ello apoyaría que, miR-200c estaría implicado en el proceso MMMI en GB.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Adam L, Zhong M, Choi W, Qi W, Nicoloso M, Arora A, Calin G, Wang H, Siefker-Radtke A, McConkey D, Bar-Eli M, Dinney C. miR-200 expression regulates epithelial-to-mesenchymal transition in bladder cancer cells and reverses resistance to epidermal growth factor receptor therapy. *Clin Cancer Res.* 15: 5060-5072 (2009).
2. Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T. let-7 microRNA functions as a potential growth suppressor in human colon cancer cell. *Biol Pharm Bull.* 29: 903-906 (2006a).
3. Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T. MicroRNAs 143 and 145 are possible common onco-microRNAs in human cancers. *Oncol Rep.* 16: 845-850 (2006 b).
4. Albertson D. Gene amplification in cancer. *Trends Genet.* 22: 447-455 (2006).
5. Aldape K, Zadeh G, Mansouri S, Reifenberger G, Von Deimling A. Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol.* 129: 829-848 (2015).
6. Amalfitano G, Chatel M, Paquis P, Michiels JF. Fluorescence in situ hybridization study of aneuploidy of chromosomes 7, 10, X, and Y in primary and secondary glioblastomas. *Cancer Genet Cytogenet.* 116: 6-9 (2000).
7. An L, Liu Y, Wu A, Guan Y. microRNA-124 inhibits migration and invasion by down-regulating ROCK1 in glioma. *PLoS One* 8: e69478 (2013).
8. Armstrong T, Prabhu S, Aldape K, Hossan B, Kang S, Childress A, Tolentino L, Gilbert M. A case of soft tissue metastasis from glioblastoma and review of the literature. *Neurooncol.* 103: 167-172 (2011).
9. Arvold N, Reardon D. Treatment options and outcomes for glioblastoma in the elderly patient. *Clin Interv Aging.* 9: 357-367(2014).
10. Bagga S, Bracht J, Hunter S, Massirer K, Holtz J, Eachus R, Pasquinelli A. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell* 122: 553-563 (2005).

11. Bandrés E, Cubedo E, Agirre X, Malumbres R, Zárate R, Ramirez N, Abajo A, Navarro A, Moreno I, Monzó M, García-Foncillas J. Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. *Mol Cancer*. 5: 29 (2006).
12. Barbarotto E, Schmittgen T, Calin G. MicroRNA and cancer: profile, profile, profile. *Int J Cancer*. 122: 969-977(2008).
13. Bartel D. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell* 116: 281-297 (2004).
14. Bartel D. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136.2: 215-233 (2009).
15. Batchelor T, Betensky R, Esposito J, Pham L, Dorfman M, Piscatelli N, Jhung S, Rhee D, Louis D . Age-dependent prognostic effects of genetic alterations in glioblastoma. *Clin Cancer Res*. 10: 228-233 (2004).
16. Beaumont T, Kupsy W, Barger G, Sloan A. Gliosarcoma with multiple extracranial metastases: case report and review of the literature. *J Neurooncol*. 83: 39-46 (2007).
17. Behin A, Hoang-Xuan K, Carpentier A, Delattre J. Primary brain tumours in adults. *Lancet* 361: 323-331(2003).
18. Bei Y, Song Y, Wang F, Dimitrova J, Xiang Y, Zhao Y, Liu J, Xiao J, Yang C. miR-382 targeting PTEN-Akt axis promotes liver regeneration. *Oncotarget* 7: 1584-1597 (2016).
19. Bello M, Rey J. The p53/Mdm2/p14ARF cell cycle control pathway genes may be inactivated by genetic and epigenetic mechanisms in gliomas. *Cancer Genet Cytogenet*. 164: 172-173 (2006).
20. Bendoraitė A, Knouf E, Garg K, Parkin R, Kroh E, O'Briant K, Ventura A, Godwin A, Karlan B, Drescher C, Urban N, Knudsen B, Tewari M. Regulation of miR-200 family microRNAs and ZEB transcription factors in ovarian cancer: evidence supporting a mesothelial-to-epithelial transition. *Gynecol Oncol*. 116: 117-125 (2010).
21. Benito R, Gil R, Quilis V, Perez M, Gregori- M, Roldan P, Gonzalez J, Cerdá M, Lopez C. Primary glioblastomas with and

- without EGFR amplification: relationship to genetic alterations and clinicopathological features. *Neuropathology* 30: 392-400(2010).
22. Berger B, Capper D, Lemke D, Niclas P, Platten M, Weller M, von Deimling A, Wick W, Weile M. Defective p53 antiangiogenic signaling in glioblastoma. *Neuro Oncol.* 12: 894–907 (2010).
23. Berkman R, Clark W, Saxena A, Robertson J, Oldfield E, Ali I. Clonal composition of glioblastoma. *J Neurosurg.* 77: 432-437 (1992).
24. Besse A, Sana J, Lakomy R, Kren L, Fadrus P, Smrcka M, Hermanova M, Jancalek R, Reguli S, Lipina R, Svoboda M, Slampa P, Slaby O. MiR-338-5p sensitizes glioblastoma cells to radiation through regulation of genes involved in DNA damage response. *Tumour Biol.* 37:7719-7727 (2015).
25. Biernat W, Kleihues P, Yonekawa Y, Ohgaki H. Amplification and overexpression of *MDM2* in primary (de novo) glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* 56.2: 180-185 (1997).
26. Bigner D, McLendon R, Bruner J. Pathology of tumors of the nervous system. London: RNAold (1998).
27. Bigner S, Vogelstein B. Cytogenetics and molecular genetics of malignant gliomas and medulloblastoma. *Brain Pathol.* 1.1: 12-18 (1990).
28. Bittel D, Kibiryeveva N, Butler M. Methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification analysis of subjects with chromosome 15 abnormalities. *Genet Test.* 11.4: 467-475 (2007).
29. Bleeker F, Molenaar R, Leenstra S. Recent advances in the molecular understanding of glioblastoma. *Neurooncol.* 108: 11-27 (2012).
30. Bockmeyer C, Christgen M, Müller M, Fischer S, Ahrens P, Länger F, Kreipe H, Lehmann U. MicroRNA profiles of healthy basal and luminal mammary epithelial cells are distinct and reflected in different breast cancer subtypes. *Breast Cancer Res Treat.* 130: 735-745(2011).

31. Bolke E, Matuschek C. Glioblastoma Multiforme Metastasis Outside the CNS: Three Case Reports and Possible Mechanisms of Escape. *J Clin Oncol.* 32: 80-84 (2014).
32. Bostrom J, Meyer-Puttlitz B, Wolter M, Blaschke B, Weber RG, Lichter P, Ichimura K, Collins VP, Reifenberger G. Alterations of the tumor suppressor genes *CDKN2A* (*p16(INK4a)*), *p14(ARF)*, *CDKN2B* (*p15(INK4b)*), and *CDKN2C* (*p18(INK4c)*) in atypical and anaplastic meningiomas. *Am J Pathol.* 159: 661-669 (2001).
33. Bracken C, Li X, Wright J, Lawrence D, Pillman K, Salmanidis M, Anderson M, Dredge B, Gregory P, Tsykin A, Neilsen C, Thomson D, Bert A, Leerberg J, Yap A, Jensen K, Khew-Goodall Y, Goodall G. Genome-wide identification of miR-200 targets reveals a regulatory network controlling cell invasion. *EMBO* 33: 2040-2056 (2014).
34. Brennan C, Momota H, Hambardzumyan D, Ozawa T, Tandon A, Pedraza A, Holland E. Glioblastoma subclasses can be defined by activity among signal transduction pathways and associated genomic alterations. *PLoS One* 4: 7752 (2009).
35. Brown T, Juhlin C, Healy J, Prasad L, Korah R, Carling T. Frequent silencing of *RASSF1A* via promoter methylation in follicular thyroid hyperplasia: a potential early epigenetic susceptibility event in thyroid carcinogenesis. *JAMA Surgery* 149: 1146-1152 (2014).
36. Bueno M, Pérez de Castro I, Gómez de Cedrón M, Santos J, Calin GA, Cigudosa J, Croce C, Fernández-Piqueras J, Malumbres M. Genetic and epigenetic silencing of microRNA-203 enhances *ABL1* and *BCR-ABL1* oncogene expression. *Cancer Cell* 13: 496-506 (2008).
37. Burger P, Kleihues P. Cytologic composition of the untreated glioblastoma with implications for evaluation of needle biopsies. *Cancer* 63: 2014-2023 (1989).
38. Burgess R, Jenkins R, Zhang Z. Epigenetic changes in gliomas. *Cancer Biol Ther.* 7: 1326-1334 (2008).
39. Burk U, Schubert J, Wellner U, Schmalhofer O, Vincan E, SpadeRNA S, Brabletz T. A reciprocal repression between *ZEB1*

and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO Reports* 9.6: 582-589 (2008).

40. Calin G. MicroRNA and cancer: what we know and what we still have to learn. *Genome Med.* 1: 78-82 (2009).

41. Calin G, Dumitru C, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *PNAS* 99: 15524-15529 (2002).

42. Calin G, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik S, Iorio M, Visone R, Sever N, Fabbri M, Iuliano R, Palumbo T, Pichiorri F, Roldo C, Garzon R, Sevignani C, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu C, Kipps T, Negrini M, Croce C. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 353: 1793-1801 (2005).

43. Calin G, Sevignani C, Dumitru C, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce C. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *PNAS* 101: 2999-3004 (2004).

44. Callaghan T, Antczak M, Flickinger T, Raines M, Myers M, Kung HJ. A complete description of the EGF-receptor exon structure: implication in oncogenic activation and domain evolution. *Oncogene* 8: 2939-2948 (1993).

45. Canel M, Serrels A, Frame MC, Brunton V. E-cadherin-integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis. *J Cell Sci.* 126: 393-401(2013).

46. Cerami E, Demir E, Schultz N, Taylor B, Sander C. Automated network analysis identifies core pathways in glioblastoma. *PLoS One* 5:8918 (2010).

47. Chan J, Krichevsky A, Kosik K. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 65: 6029-6033 (2005).

48. Chan X, Nama S, Gopal F, Rizk P, Ramasamy S, Sundaram G, Ow G, Ivshina A, Tanavde V, Haybaeck J, Kuznetsov V, Sampath P. Targeting glioma stem cells by functional inhibition of a

- prosurvival oncomiR-138 in malignant gliomas. *Cell Rep.* 2: 591-602 (2012).
49. Chen G, Zhu W, Shi D. MicroRNA-181a sensitizes human malignant glioma U87 MG cells to radiation by targeting Bcl-2. *Oncol Rep.* 23: 997-1003 (2010).
50. Chen H, Xinyi L, Wembin L, Huyong Z. MiR-130a can predict response to temozolomide in patients with Glioblastoma, independendtly of O6-methylguanine-DNA. *J Transl Med.* 13: 2-8 (2015).
51. Chu C, Rana T. Regulators and guardians of the genome. *J Cell Physiol.* 213: 412-419 (2007).
52. Chua H, Bhat-Nakshatri P, Clare S, Morimiya A, Badve S and Nakshatri H. NF-kappaB represses E cadherin expression and enhances epithelial to mesenchymal transition of mammary epithelial cells: potential involvement of ZEB-1 and ZEB-2. *Oncogene* 26: 711 – 724 (2007).
53. Chung G, Yoon J, Myung S, Lee J, Lee S, Lee S, Kim S, Hwang S, Lee H, Kim C. High expression of microRNA-15b predicts a low risk of tumor recurrence following curative resection of hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep.* 23: 113-119 (2010).
54. Chung H, Choi Y, Kim E, Han Y, Park M, Bae I. miR-29b attenuates tumorigenicity and stemness maintenance in human glioblastoma multiforme by directly targeting BCL2L2. *Oncotarget* 6: 18429-18444 (2015).
55. Ciafrè S, Galardi S, Mangiola A, Ferracin M, Liu C, Sabatino G, Negrini M, Maira G, Croce C, Farace M. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 334: 1351-1358 (2005).
56. Cimmino A, Calin G, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik S, Aqeilan R, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu C, Kipps T, Negrini M, Croce C. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *PNAS* 102: 13944-13949 (2005).
57. Claes A, Idema A, Wesseling P. Diffuse glioma growth: a guerilla war. *Acta Neuropathol.* 114: 443-458 (2007).

58. Collins, V. Mechanisms of disease: genetic predictors of response to treatment in brain tumors. *Nat Clin Pract Oncol.* 4:362-74. (2007).
59. Collins, V. Brain tumours: classification and genes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2: 2-11 (2004).
60. Costello J, Plass C, Arap W, Chapman V, Held W, Berger M, Su Huang H, Cavenee W. Cyclin-dependent kinase 6 (*CDK6*) amplification in human gliomas identified using two-dimensional separation of genomic DNA. *Cancer Res.* 57: 1250-1254 (1997).
61. Cowland J, Hother C, Gronbaek K. MicroRNAs and cancer. *APMIS* 115: 1090-1106 (2007).
62. Cultek Nota Técnica (2006) (http://www.cultek.com/inf/otros/Notas_tecnicas/transfeccion.pdf)
63. Daniunaite K, Jarmalaite S, Kalinauskaite N, Petroska D, Laurinavicius A, Lazutka JR, Jankevicius F. Prognostic value of *RASSF1* promoter methylation in prostate cancer. *J Urol.* 192: 1849-1855 (2014).
64. Deng X, Ma L, Wu M, Zhang G, Jin C, Guo Y, Liu R. miR-124 radiosensitizes human glioma cells by targeting CDK4. *Neurooncol.* 114: 263–274 (2013).
65. Diedrich U, Lucius J, Baron E, Behnke J, Pabst B, Zoll B. Distribution of epidermal growth factor receptor gene amplification in brain tumours and correlation to prognosis. *Neurology* 242: 683-688 (1995).
66. Dong P, Konno Y, Watari H, Hosaka M, Noguchi M, and Sakuragi N. The impact of microRNA-mediated PI3K/AKT signaling on epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness in endometrial cancer. *J Transl Med.* 12: e231 (2014).
67. Domagala T, Konstantopoulos N, Smyth F, Jorissen RN, Fabri L, Geleick D, Lax I, Schlessinger J, Sawyer W, Howlett GJ, Burgess AW, Nice EC. Stoichiometry, kinetic and binding analysis of the interaction between epidermal growth factor (EGF) and the extracellular domain of the EGF receptor. *Growth Factors* 18: 11-29 (2000).
68. Doetsch F The glial identity of neural stem cells. *Nat Neurosci* 6: 1127–1134 (2003).

69. Drake G, Brun L, Li M. MicroRNAs in Glioblastoma: Profiling studies and therapeutic impacts. *Mol Cell Pharm* 3: 93-105 (2011).
70. Edwards L, Woolard K, Son M, Li A, Lee J, Ene C, Mantey S, Maric D, Song H, Belova G, Jensen R, Zhang W, Fine H. Effect of brain- and tumor-derived connective tissue growth factor on glioma invasion. *J Natl Cancer Inst.* 103: 1162-1178 (2011).
71. 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).
72. Ekstrand A, Sugawa N, James C, Collins V. Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails. *PNAS* 89: 4309-4313 (1992).
73. Ellerbroek S, Halbleib J, Benavidez M. Phosphatidylinositol 3-kinase activity in epidermal growth factor-stimulated matrix metalloproteinase-9 production and cell surface association. *Cancer Res.* 61: 1855-1861(2001).
74. Esteller M, Corn P, Baylin S, Herman J. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res.* 61: 3225-3229 (2001).
75. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*358: 1148-1159 (2008).
76. Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E. Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* 132: 9-14 (2008).
77. Eulalio A, Rehwinkel J, Stricker M, Huntzinger E, Yang SF, Doerks T, Dorner S, Bork P, Boutros M, Izaurralde E. Target-specific requirements for enhancers of decapping in miRNA-mediated gene silencing. *Genes dev.* 21: 2558-2570 (2007).
78. Ewald C, Hofmann T, Kuhn SA, Deufel T, Beetz C, Kalff R. Methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification in meningiomas. *Neurooncol* 90: 267–273 (2008).
79. Fang R, Xiao T, Fang Z, Sun Y, Li F, Gao Y, Feng Y, Li L, Wang Y, Liu X, Chen H, Liu XY, Ji H. MicroRNA-143 (miR-143) regulates cancer glycolysis via targeting hexokinase 2 gene. *J Biol Chem.* 287: 23227-23235 (2012).

80. Filipowicz W, Bhattacharyya S, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet.* 9: 102-114 (2008).
81. Fisher J, Schwartzbaum J, Wrensch M, Wiemels J. Epidemiology of brain tumors. *Neurol Clin* 25: 867-890 (2007).
82. Frankel LB, Christoffersen NR, Jacobsen A, Lindow M, Krogh A, Lund AH. Programmed cell death 4 (*PDCD4*) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells. *J Biol Chem.* 283: 1026-1033 (2008).
83. Frederick L, Wang XY, Eley G, James CD. Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. *Cancer Res.* 60: 1383-1387 (2000).
84. 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).
85. Furnari F, Cloughesy T, Cavenee W, Mischel P. Heterogeneity of epidermal growth factor receptor signalling networks in glioblastoma. *Nat Rev Cancer* 15: 302-310 (2015).
86. Furnari F, Fenton T, Bachoo R, Mukasa A, Stommel J, Stegh A, Hahn W, Ligon K, Louis D, Brennan C, Chin L, De Pinho R, Cavenee W. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev.* 21: 2683-2710 (2007).
87. Gabriely G, Wurdinger T, Kesari S. MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators. *Mol Cell Biol.* 28: 5369-5380 (2008).
88. Galloway M. CD34 expression in glioblastoma and giant cell glioblastoma. *Clin Neuropathol.* 29: 89-93 (2010).
89. Gan H, Cvrljevic A, Johns T. The epidermal growth factor receptor variant III (*EGFRvIII*): where wild things are altered. *FEBS* 280: 5350-5370(2013).
90. 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).

91. Garzon R, Pichiorri F, Palumbo T, Visentini M, Aqeilan R, Cimmino A, Wang H, Sun H, Volinia S, Alder H, Calin G, Liu C, Andreeff M, Croce CM. MicroRNA gene expression during retinoic acid-induced differentiation of human acute promyelocytic leukemia. *Oncogene* 26: 4148-4157 (2007).

92. Gibbons D, Lin W, Creighton C, Rizvi ZH, Gregory PA, Goodall G, Thilaganathan N, Du L, Zhang Y, Pertsemlidis A, Kurie J. Contextual extracellular cues promote tumor cell EMT and metastasis by regulating miR-200 family expression. *Genes Dev.* 23: 2140-51 (2009).

93. Gil R, Lopez C, Benito R, López J, Callaghan R, Pellín A, Roldán P, Cerdá-Nicolas M. Concurrent EGFR amplification and TP-53 mutation in glioblastomas. *Clin Neuropathol.* 26: 224-231 (2007).

94. Gillies JK, Lorimer IA. Regulation of p27Kip1 by miRNA 221/222 in glioblastoma. *Cell Cycle* 6: 2005-2009 (2007).

95. Godlewski J, Nowicki M, Bronisz A, Williams S, Otsuki A, Nuovo G, Raychaudhury A, Newton H, Chiocca E, Lawler S. Targeting of the Bmi-1 oncogene/stem cell renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal. *Cancer Res.* 68:9125-9130 (2008).

96. Graff J, Gabrielson E, Fujii H, Baylin SB, Herman J. Methylation patterns of the E-cadherin 5' CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of E-cadherin expression during metastatic progression. *J Biol Chem.* 275: 2727-3272 (2000).

97. Gregory P, Bert A, Paterson E, Barry S, Tsykin A, Farshid G, Vadas M, Khew-Goodall Y, Goodall G. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol.* 10: 593-601 (2008).

98. Gresch O, Altrogge L. Transfection of difficult-to-transfect primary mammalian cells. *Methods Mol Biol.* 80: 65-74 (2012).

99. Griffiths-Jones S, Grocock R, van Dongen S, Bateman A, Enright A. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res.* 34: 140-144 (2006).
100. Guo E, Wang Z, Wang S. MIR-200c and miR-141 inhibit ZEB1 synergistically and suppress glioma cell growth and migration. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 20: 3385-3391 (2016).
101. Haberler C, Wöhrer A. Clinical Neuropathology practice news 2-2014: ATRX, a new candidate biomarker in gliomas. *Clinical Neuropath.* 33: 108-111(2014).
102. Hagemann C, Meyer C, Stojic J, Eicker S, Gerngras S, Kühnel S, Roosen K, Vince GH. High efficiency transfection of glioma cell lines and primary cells for overexpression and RNAi experiments. *J Neurosci Methods* 156: 194-202 (2006).
103. Halatsch M, Schmidt U, Unterberg A, Vougioukas V. Uniform *MDM2* overexpression in a panel of glioblastoma multiforme cell lines with divergent *EGFR* and p53 expression status. *AntiCancer Res.* 26: 4191-4194(2006).
104. Hamilton J, Rapp M, Schneiderhan T, Sabel M, Hayman A, Scherer A, Kröpil P, Budach W, Kretschmar, Gerber U, Prabhu S, Ginsberg L, Bölke E, Matuschek C. Glioblastoma Multiforme Metastasis Outside the CNS: Three Case Reports and Possible Mechanisms of Escape. *J Clin Oncol.* 32: 80-84(2014).
105. Harari P, Huang S. Radiation response modification following molecular inhibition of epidermal growth factor receptor signaling. *Semin Radiat Oncol.* 11:281–289 (2001).
106. Hasegawa T, Pahuski M, Glavich G, Lewis B, Esquela A. The miR-888 cluster: a new oncogenic cluster involved in aggressive prostate cancer. *American Association for Cancer Res Meeting* 57 (2016).
107. Hartmann C, Meyer J, Balss J, Capper D, Mueller W, Christians A, Felsberg J, Wolter M, Mawrin C, Wick W, Weller M, Herold-Mende C, Unterberg A, Jeuken JW, Wesseling P, Reifenberger G, von Deimling A. 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 (2009).

108. Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, Yamada H, Yanagisawa K, Tomida S, Yatabe Y, Kawahara K, Sekido Y, Takahashi T. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res.* 65: 9628-9632 (2005).
109. He H, Jazdzewski K, Li W, Liyanarachchi S, Nagy R, Volinia S, Calin GA, Liu CG, Franssila K, Suster S, Kloos R, Croce C, de la Chapelle A. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *PNAS* 102: 19075-19080 (2005a).
110. He L, Thomson J, Hemann M, HeRNAndo-Monge E, Mu D, Goodson S, Powers S, Cordon-Cardo C, Lowe S, Hannon G, Hammond S. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 435: 828-833 (2005b).
111. He Z, Cen D, Luo X, Li D, Li P, Liang L, Meng Z. Downregulation of miR-383 promotes glioma cell invasion by targeting insulin-like growth factor 1 receptor. *Med Oncol.* 30: e557 (2013).
112. Hegi M, Zur H, Ruedi D, Malin G, Kleihues P. Hemizygous or homozygous deletion of the chromosomal region containing the p16INK4a gene is associated with amplification of EGF receptor gene in glioblastomas. *Int J Cancer* 73: 57-63(1997).
113. Hegi M, Diserens A, Gorlia T, Hamou M, Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner J, Mason W, Mariani L. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 352: 997-1003 (2005).
114. Hermanson M, Funa K, Hartman M, Claesson-Welsh L, Heldin CH, Westermark B, Nistér M. Platelet-derived growth factor and its receptors in human glioma tissue: expression of messenger RNA and protein suggests the presence of autocrine and paracrine loops. *Cancer Res.* 52: 3213-3219 (1992).
115. Hess K. Extent of resection as a prognostic variable in the treatment of gliomas. *Neurooncol.* 42: 227-231 (1999).
116. Hesson L, Binche I, KrCriniere D, Hoang I, Maher E, Latif F. Frequent epigenetic inactivation of *RASSF1A* and *BLU* genes located within the critical 3p21.3 region in gliomas. *Oncogene* 23: 2408–2419 (2004).

117. Homma T, Fukushima T, Vaccarella S, Yonekawa Y, Di Patre PL, Franceschi S, Ohgaki H. Correlation among pathology, genotype, and patient outcomes in glioblastoma. *J Neuropathol Exp Neurol.* 65: 846-854 (2006).
118. Honda, R, Tanaka, H, Yasuda, H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Letter* 420: 25-27 (1997).
119. Horiguchi K, Tomizawa Y, Tosaka M, Ishiuchi S, iKurihara H, Mori M, Saito N. Epigenetic inactivation of *RASSF1A* candidate tumor suppressor gene at 3p21.3 in brain tumors. *Oncogene* 22: 7862–7865 (2003).
120. Hoshida Y, Villanueva A, Kobayashi M, Peix J, Chiang D, Camargo A, Gupta S, Moore J, Wrobel MJ, Lerner J, Reich M, Chan JA, Glickman JN, Ikeda K, Hashimoto M, Watanabe G, Daidone M, Roayaie S, Schwartz M, Thung S, Salvesen HB, Gabriel S, Mazzaferro V,. Gene expression in fixed tissues and outcome in hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med.* 359: 1995-2004 (2008).
121. Hu X, Macdonald D, Huettner P, Feng Z, El Naqa I, Schwarz J, Mutch D, Grigsby P, Powell S, Wang X. A miR-200 microRNA cluster as prognostic marker in advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 114: 457-464 (2009).
122. Huang S, Harari P. Modulation of radiation response after epidermal growth factor receptor blockade in squamous cell carcinomas: inhibition of damage repair, cell cycle kinetics, and tumor angiogenesis. *Clin Cancer Res.* 6: 2166–2174 (2000).
123. Huncharek M, Kupelnick B. Epidermal growth factor receptor gene amplification as a prognostic marker in glioblastoma: results of a meta-analysis. *Oncol Res.* 12: 107-112 (2000).
124. Hur K, Toiyama Y, Takahashi M, Balaguer F, Nagasaka T, Koike J, Hemmi H, Koi M, Boland C, Goel A. MicroRNA-200c modulates epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in human colorectal cancer metastasis. *Gut* 62: 1315-1326 (2013).
125. Hurteau G, Carlson J, Spivack S, Brock G. Overexpression of the microRNA hsa-miR-200c leads to reduced expression of transcription factor 8 and increased expression of E-cadherin. *Cancer Res.* 67: 7972-6 (2007).

126. Huse J, Brennan C, Hambardzumyan D, Wee B, Pena J, Rouhanifard SH, Sohn-Lee C, le Sage C, Agami R, Tuschl T, Holland E. The PTEN-regulating microRNA miR-26a is amplified in high-grade glioma and facilitates gliomagenesis in vivo. *Genes Devel.* 23: 1327-1337 (2009).
127. Huse J, Holland E. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Cancer* 10: 319-331(2010).
128. Huse J, Phillips H, Brennan C. Molecular subclassification of diffuse gliomas: seeing order in the chaos. *Glia* 59: 1190-1109 (2011).
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).
130. Huveneers S, Danen E. Adhesion signaling – crosstalk between integrins, Src and Rho. *J Cell Sci* 122: 1059-1069 (2009).
131. Ichimura K, Bolin M, Goike H, Schmidt E, Moshref A, Collins V. Deregulation of the p14ARF/MDM2/p53 pathway is a prerequisite for human astrocytic gliomas with G1-S transition control gene abnormalities. *Cancer Res.* 60: 417-424 (2000).
132. Iorio M, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Ménard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin G, Querzoli P, Negrini M, Croce C. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res.* 65: 7065-7070 (2005).
133. Iwamoto F, Cooper A, Reiner A, Nayak L, Abrey L. Glioblastoma in the elderly. *Cancer* 115: 3758–3766 (2009).
134. Jakovlevs A, Vanags A, Balodis D, Gardovskis J, Strumfa I. Heterogeneity of Ki-67 and p53 Expression in Glioblastoma. *Acta quirúrgica latviensis* 14: 11-14 (2014).
135. Jaros E, Perry R, Adam L, Kelly P, Crawford P, Kalbag R, Mendelow A, Sengupta R, Pearson A. Prognostic implications of p53 protein, epidermal growth factor receptor, and Ki-67 labelling in brain tumours. *Cancer* 66: 373-385 (1992).

136. Jeuken J, Cornelissen S, Boots-Sprenger S, Gijzen S, Wesseling P. Multiplex ligation-dependent probe amplification: a diagnostic tool for simultaneous identification of different genetic markers in glial tumors. *J Mol Diagn.* 8: 433-443 (2006).
137. Jiang Z, Wang H, Li Y, Hou Z, Ma N, Chen W, Zong Z, Chen S. MiR-129-5p is down-regulated and involved in migration and invasion of gastric cancer cells by targeting interleukin-8. *Neoplasma* 63: 673-680(2016).
138. Jin W, Xu X, Yang T, Hua Z. p53 mutation, *EGFR* gene amplification and loss of heterozygosity on chromosome 10, 17 p in human gliomas. *Chin Med J (Engl)* 113: 662-666 (2000).
139. Jin Y, Xiao W, Song T, Feng G, Dai Z. Expression and Prognostic Significance of p53 in Glioma Patients: A Meta-analysis. *Neurochem Res.* 41: 1723-1731(2016).
140. Johnson S, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 120: 635-647 (2005).
141. Jung C, Foerch C, Schänzer A, Heck A, Plate KH, Seifert V, Steinmetz H, Raabe A, Sitzer M. Serum GFAP is a diagnostic marker for glioblastoma multiforme. *Brain* 130: 3336-3341 (2007).
142. Jurmeister S, Baumann M, Balwierz A, Keklikoglou I, Ward A, Uhlmann S, Zhang J, Wiemann S, Sahin O. MicroRNA-200c Represses Migration and Invasion of Breast Cancer Cells by Targeting Actin-Regulatory Proteins FHOD1 and PPM1F. *Mol Cell Biol.* 32: 633–651(2012).
143. Kahlert U, Maciaczyk D, Doostkam S, Orr B, Simons B, Bogiel T, Reithmeier T, Prinz M, Schubert J, Niedermann G, Brabletz T, Eberhart C, Nikkhah G, Maciaczyk J. Activation of canonical *WNT/β-catenin* signaling enhances in vitro motility of glioblastoma cells by activation of *ZEB1* and other activators of epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Lett.* 325: 42-53(2012).
144. Kahlert UD, Nikkhah G, Maciaczyk J. Epithelial-to-mesenchymal (-like) transition as a relevant molecular event in malignant gliomas. *Cancer Lett.* 331: 131-138 (2013).

145. Kalluri R, Weinberg RA. Epithelial-to-mesenchymal(-like) transition as a relevant molecular event in malignant gliomas. *Cancer Lett.* 331: 131-138 (2013).
146. Kang C, Zhang Z, Jia Z, Wang G, Qiu M, Zhou H, Yu S, Chang H, Jiang H, Pu J. Suppression of EGFR expression by antisense or small interference RNA inhibits U251 glioma cell growth in vitro and in vivo. *Cancer Gene Ther* 13: 530–538 (2006).
147. Kannan K, Inagaki A, Silber J, Gorovets D, Zhang J, Kasthuber E, Heguy A, Petrini J, Chan T, Huse J. Whole-exome sequencing identifies ATRX mutation as a key molecular determinant in lower-grade glioma. *Oncotarget* 3: 1194-1203(2012).
148. Karamitopoulou E, Perentes E, Diamantis I, Maraziotis T. Ki-67 immunoreactivity in human central nervous system tumors: a study with MIB 1 monoclonal antibody on archival material. *Acta Neuropathol.* 87: 47-54 (1994).
149. Kaur H, Phillips P, Burden SM, Kerstetter A, Basilion J, Sloan A, Brady S. Cadherin-11, a marker of the mesenchymal phenotype, regulates glioblastoma cell migration and survival in vivo. *Mol Cancer. Res.* 10: 293-304 (2012).
150. Kefas B, Godlewski J, Comeau L, Li Y, Abounader R, Hawkinson M, Lee J, Fine H, Chiocca EA, Lawler S, Purow B. microRNA-7 inhibits the epidermal growth factor receptor and the *Akt* pathway and is down-regulated in glioblastoma. *Cancer Res.* 68: 3566-3572 (2008).
151. Killela P, Reitman Z, Jiao Y, Bettegowda C, Agrawal N, Diaz L , Friedman A, Friedman H, Gallia G, Giovannella B. *TERT* promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *PNAS* 110: 6021–6026 (2013).
152. Kim J, Zhang Y, Skalski M, Hayes J, Kefas B, Schiff D, Purow B, Parsons S, Lawler S, Abounader R. microRNA-148a is a prognostic oncomiR that targets MIG6 and BIM to regulate EGFR and apoptosis in glioblastoma. *Cancer Res.* 74: 1541-1553 (2014).
153. Kim T, Huang W, Park R, Park P, Johnson M. A developmental taxonomy of glioblastoma defined and maintained by MicroRNAs. *Cancer Res* 71: 3387-3399 (2011).

154. Kleihues P, Cavanee W K. World Health Organisation classification of tumours: Pathology and genetics of tumours of the nervous system. Lyon: IARC (2000).
155. Kondo I, Shimizu N. Mapping of the human gene for epidermal growth factor receptor (EGFR) on the p13 leads to q22 region of chromosome 7. *Cytogenet Cell Genet.* 35: 9-14 (1983).
156. Kong D, Li Y, Wang Z, Banerjee S, Ahmad A, Kim HR, Sarkar FH. miR-200 regulates PDGF-D-mediated epithelial-mesenchymal transition, adhesion, and invasion of prostate cancer cells. *Stem Cells* 27: 1712-1721 (2009).
157. Korpál M, Lee ES, Hu G, Kang Y. The miR-200 Family Inhibits Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Cell Migration by Direct Targeting of E-cadherin Transcriptional Repressors *ZEB1* and *ZEB2*. *Biological Chemistry* 283: 14910–14914 (2008).
158. Korshunov A, Sycheva R, Golanov, A. Genetically distinct and clinically relevant subtypes of glioblastoma defined by array-based comparative genomic hybridization (array-CGH). *Acta Neuropathol.* 111: 465-474(2006).
159. Krex D, Klink B, Hartmann C, von Deimling A, Pietsch T, Simon M, Sabel M, Steinbach JP, Heese O, Reifenberger G, Weller M, Schackert G. Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain* 130: e606 (2007).
160. Kriegl A, Liu Y, Cohen B, Usa K, Liu Y, Liang M. MiR-382 targeting of kallikrein 5 contributes to renal inner medullary interstitial fibrosis. *Physiol Genomics* 44: 259-267(2012).
161. Kruger J, Reddy K. Distinct mechanisms mediate the initial and sustained phases of cell migration in epidermal growth factor receptor-overexpressing cells. *Mol Cancer Res.* 1: e108 (2003).
162. Kusenda M, Mayer J, Pospisilova S. MicroRNA Biogenesis, functionality and cancer relevance. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 150: 205-215 (2006).
163. Kuwahara Y, Tanabe C, Ikeuchi T. Alternative mechanisms of gene amplification in human cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 41:125–132 (2004).

164. Kwon C, Zhao D, Chen J, Alcantara S, Li Y, Burns D, Mason R, Lee E, Wu H, Parada L. Pten haploinsufficiency accelerates formation of high-grade astrocytomas. *Cancer Res.* 68: 3286-3294 (2008).
165. Labussiere M, Boisselier B, Mokhtari K, Di Stefano AL, Rahimian A, Rossetto M, Ciccarino P, Saulnier O, Pattera R, Marie Y. Combined analysis of *TERT*, *EGFR*, and *IDH* status defines distinct prognostic glioblastoma classes. *Neurology* 83:1200–1206 (2014).
166. Laddha S, Nayak S, Paul D, Reddy R, Sharma C, Jha P, Hariharan M, Agrawal A, Chowdhury S, Sarkar C, Mukhopadhyay A. Genome-wide analysis reveals downregulation of miR-379/miR-656 cluster in human cancers. *Biol Direct* 8: 1-14 (2013).
167. Lang M, Yang S, Zhao C, Sun G, Murai K, Wu X, Wang J, Gao H, Brown C, Liu X, Zhou J, Peng L, Rossi J, Shi Y. Genome-wide profiling identified a set of miRNAs that are differentially expressed in glioblastoma stem cells and normal neural stem cells. *PLoS One* 7: e36248 (2012).
168. Larue L, Bellacosa A. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene* 24: 7443–7454 (2005).
169. Lax I, Bellot F, Howk R, Ullrich A, Givol D, Schlessinger J. Functional analysis of the ligand binding site of EGF-receptor utilizing chimeric chicken/human receptor molecules. *EMBO* 8: 421-427 (1989).
170. Layfield L, Willimore C, Tripp S. Epidermal growth factor receptor in amplification and protein expression in glioblastoma multiforme: prognostic significance and relationship to other prognostic factors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 91: 91-96 (2006).
171. Le G, Taubenslag K, Andl C. The regulation of cell-cell adhesion during epithelial-mesenchymal transition, motility and tumor progression. *Cell Adh Migr.* 6: 365–373. (2012)
172. Le Sage C, Nagel R, Egan DA, Schrier M, Mesman E, Mangiola A, Anile C, Maira G, Mercatelli N, Ciafrè S, Farace MG, Agami R. Regulation of the p27(Kip1) tumor suppressor by miR-

- 221 and miR-222 promotes cancer cell proliferation. *EMBO* 26: 3699-3708 (2007).
173. Lee H, Finniss S, Cazacu S, Bucris E, Ziv-Av A, Xiang C, Bobbitt K, Rempel S, Hasselbach L, Mikkelsen T, Slavin S, Brodie C. Mesenchymal stem cells deliver synthetic microRNA mimics to glioma cells and glioma stem cells and inhibit their cell migration and self-renewal. *Oncotarget* 4: 346-361(2013).
174. 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).
175. Lee M, Chou C, Tang M, Shen M. Epithelial-mesenchymal transition in cervical cancer: correlation with tumor progression, epidermal growth factor receptor overexpression, and snail up-regulation. *Clin Cancer Res* 14: 4743-4750 (2008).
176. Lesniak M, Brem H. Target therapy for brain tumours. *Natural Review Drug Discovery* 3: 499-508 (2004).
177. Lewis B, Shih I, Jones-Rhoades M, Bartel D, Burge C. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115: 787-798 (2003).
178. Lewis L, Rodriguez F, Giannini C, Scheithauer B, Necela BM, Sarkaria J, Anastasiadis P. Misregulated E-cadherin expression associated with an aggressive brain tumor phenotype. *PLoS One* 5: 13665 (2010).
179. Li H, Fan X, Houghton J. Tumor microenvironment:the role of the tumor stroma in cancer,”. *J Cell Biochem.* 101: 805–815 (2007).
180. Li H, Schmid G, Wang D, Zhao Y, Yang X, Su B, Zhou C. Blocking the PI3K/AKT and MEK/ERK signaling pathways can overcome gefitinib-resistance in non-small cell lung cancer cell lines. *Adv Med Sci.* 56: 275–284 (2011).

181. Li Y, Li Y, Ge P, Ma C. MiR-126 Regulates the ERK Pathway via targeting KRAS to Inhibit the Glioma Cell Proliferation and Invasion. *Mol Neurobiology* (sn) (2016).
182. Li Y, VandenBoom T , Kong D, Wang Z, Ali S, Philip P, Sarkar F. Up-regulation of miR-200 and let-7 by natural agents leads to the reversal of epithelial-to-mesenchymal transition in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* 69: 6704-6712 (2009).
183. Liang Y, Diehn M, Watson N, Bollen A, Aldape K, Nicholas M, Lamborn K , Berger M , Botstein D, Brown P , and Israel M. Gene expression profiling reveals molecularly and clinically distinct subtypes of glioblastoma multiforme . *PNAS* 102: 5814-5819 (2005).
184. Life Technologies. www.thermofisher.com
185. López C, Cerda M, Gil R, Pellin A, Lopez J , Callaghan R, Benito R, Roldan P, Piquer J, Llacer J, Barbera J. Association of chromosome 7, chromosome 10 and *EGFR* gene amplification in glioblastoma. *Clinical Neuropathol.* 24: 209-218 (2005).
186. López C, Gil- Benso R, Monleon D, Gonzalez J, Cerdá M. Primary Glioblastoma with different patterns of *EGFR* Amplification and the relationship with gene expression profile. Garami M. *Molecular Targets of CNS Tumors.* Croatia: Intech. 485-514 (2011).
187. López C, Gil R, Ferrer R, Benito R, Serna E, Gonzalez 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. *Mod Pathol.* 23: 856-865 (2010).
188. Louis D. Molecular Pathology of Gliomas. *Annual Review of Phatology Mechanisms of Disease* 1: 97-117 (2006).
189. Louis D. The p53 gene and protein in human brain tumors. *J Neuropathol Exp Neurol.* 53: 11-21 (1994).
190. Louis D, Ohgaki H, Wiestler O, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer B, Kleihues P. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol.* 114: 97-109 (2007).

191. Louis D, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella D, Cavenee W, Ohgaki H, Otmar D, Kleihues W, Ellison D. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 131: 803–820 (2016).
192. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435: 834-838 (2005).
193. Lujambio A, Ropero S, Ballestar E, Fraga MF, Cerrato C, Setién F, Casado S, Suarez-Gauthier A, Sanchez-Cespedes M, Git A, Spiteri I, Das PP, Caldas C, Miska E, Esteller M. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res.* 67: 1424-1429 (2007).
194. Maher, E. A., Brennan, C., Wen, P. Y., Durso, L., Ligon, K. L., Richardson, A., Khatry, D., Feng, B., Sinha, R., Louis, D. N., Quackenbush, J., Black, P. M., Chin, L., and DePinho, R. A. Marked genomic differences characterize primary and secondary glioblastoma subtypes and identify two distinct molecular and clinical secondary glioblastoma entities. *Cancer Res.* 66: 11502-11513 (2006).
195. Makeyev EV, Zhang J, Carrasco MA, Maniatis T. The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell.* 27: 435-448 (2007).
196. Mao X, Hamoudi RA. Molecular and cytogenetic analysis of glioblastoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 122: 87-92 (2000).
197. Marchini S, Cavalieri D, Fruscio R, Calura E, Garavaglia D, Fuso Nerini I, Mangioni C, Cattoretti G, Clivio L, Beltrame L, Katsaros D, Scarampi L, Menato G, Perego P, Chiorino G, Buda A, Romualdi C, D'Incalci M. Association between miR-200c and the survival of patients with stage I epithelial ovarian cancer: a retrospective study of two independent tumour tissue collections. *Lancet Oncol.* 12: 273-285(2011).
198. 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).
199. Martínez R, Setien F, Voelter C, Casado S, Quesada M, Schackert G, Esteller M. CpG island promoter hypermethylation of the pro-apoptotic gene caspase-8 is a common hallmark of relapsed glioblastoma multiforme. *Carcinogenesis* 28: 1264–1268 (2007a).
200. Martínez V, Franco C, Lomas J, Peña C, de Campos J, Isla A, Rey J. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) screening in meningioma. *Cancer Genet Cytogenet.* 173: 170-172 (2007b).
201. Martínez V, Franco C, Alvarez L, de Campos J, Isla A, Vaquero J, Lassaletta L, Casartelli C y Rey J. Meningiomas and schwannomas: Molecular subgroup classification found by expression arrays. *Int J Oncol.* 34: 493-504 (2009).
202. Matsuo M, Sakurai H, Saiki I. ZD1839, a selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, shows antitumor activity using a hepatocellular carcinoma model. *Mol Cancer. Therapy* 2: e557 (2003).
203. Mellinghoff I, Wang M, Vivanco I, Haas Kogan D, Zhu S, Dia E, Lu K, Mischel P. Molecular determinants of the response of glioblastoma to EGFR kinase inhibitors. *N Engl J Med.* 353: 2012-2024 (2005).
204. Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the *PTEN* tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* 133: 647-658 (2007).
205. Mischel P, Nelson S, Cloughesy T. Molecular analysis of glioblastoma: pathway profiling and its implications for patient therapy. *Cancer Biol Ther.* 2: 242-247 (2003).
206. Mitelman F, Johansson B, Mertens F. Database of chromosome aberration in cancer. <http://cgap.ncbi.nih.gov/chromosomes/mitelman> (2005).
207. Mizoguchi M, Betensky R, Batchelor T, Bernay C, Louis D, Nutt C. Activation of STAT3, MAPK, and AKT in malignant

- astrocytic gliomas: correlation with EGFR status, tumor grade, and survival. *J Neuropathol Exp Neurol.* 65: 1181-1182 (2006).
208. Moller H, Rasmussen A, Andersen H, Johnsen K, Henriksen M, Duroux M. A systematic review of microRNA in glioblastoma: micro-modulators in the mesenchymal mode of migration and invasion. *Mol Neurobiology* 47: 131-144 (2013).
209. Mongroo P, Rustgi A. The role of the miR-200 family in epithelial mesenchymal transition. *Cancer Biol Ther.* 10: 219-222 (2010).
210. Nagpal J, Jamoona A, Gulati ND, Mohan A, Braun A, Murali R, Jhanwar-Uniyal M. Revisiting the role of p53 in primary and secondary glioblastomas. *AntiCancer Res.* 26: 4633-4639 (2006).
211. Nan Y, Han L, Zhang A, Wang G, Jia Z, Yang Y, Yue X, Pu P, Zhong Y, Kang C. MiRNA-451 plays a role as tumor suppressor in human glioma cells. *Brain Res.* 1359: 14-21 (2010).
212. Neil H. Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology. *J Exp Biol.* 209: 1518-1525 (2007).
213. Nigro J, Misra A, Zhang L, Smirnov I, Colman H, Griffin C, Ozburn N, Chen M, Pan E, Koul D, Yung W, Feuerstein B G, and Aldape K. Integrated array-comparative genomic hybridization and expression array profiles identify clinically relevant molecular subtypes of glioblastoma. *Cancer Res.* 65: 1678-1686 (2005).
214. Nishizaki T, Harada K, Kubota H, Furuya T, Suzuki M, Sasaki K. Chromosome instability in malignant astrocytic tumors detected by fluorescence in situ hybridization. *J Neurooncol.* 56: 159-165 (2002).
215. Niyazi M, Zehentmayr F, Niemöller O, Eigenbrod S, Kretschmar H, Schulze-Osthoff K, Tonn J, Atkinson M, Mörtl S, Belka C. MiRNA expression patterns predict survival in glioblastoma. *Radiat Oncol.* 6: 153 (2011).
216. Normanno N, De Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello M, Carotenuto A, De Feo G, Caponigro F, Salomon D. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* 366: 2-16 (2006).

217. O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 435: 839-843 (2005).
218. Ohashi S, Natsuzaka M, Naganuma S, Kagawa S, Kimura S, Itoh H, Kalman RA, Nakagawa M, Darling DS, Basu D, Gimotty PA, Klein-Szanto AJ, Diehl JA, Herlyn M, Nakagawa H. A NOTCH3-mediated squamous cell differentiation program limits expansion of EMT-competent cells that express the ZEB transcription factors. *Cancer Res.* 21: 6836-6847(2011).
219. Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 19: 764-772 (2013).
220. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic Alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Sci.* 100: 2235-2241 (2009).
221. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol.* 170: 1445-1453 (2007).
222. Ohira T, Gemmill R, Ferguson K, Kusy S, Roche J, Brambilla E, Zeng C, Baron A, Bemis L, Erickson P, Wilder E, Rustgi A, Kitajewski J, Gabrielson E, Bremnes R, Franklin W, Drabkin HA. *WNT7a* induces E-cadherin in lung cancer cells. *PNAS* 100: 10429-10434 (2003).
223. Olayioye M, Neve R, Lane HA, Hynes N. The *ErbB* signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO* 19: 3159-3167 (2000).
224. Papagiannakopoulos T, Friedmann-Morvinski D, Neveu P, Dugas JC, Gill RM, Huillard E, Liu C, Zong H, Rowitch DH, Barres BA, Verma IM, Kosik KS. Pro-neural miR-128 is a glioma tumor suppressor that targets mitogenic kinases. *Oncogene* 31: 1884-1895 (2012).
225. Park N, Zhou H, Elashoff D, Henson B, Kastratovic D, Abemayor E, Wong DT. Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clin Cancer Res.* 15: 5473-5477 (2009).
226. Park SM, Gaur AB, Lengyel E, Peter ME. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by

- targeting the E-cadherin repressors *ZEB1* and *ZEB2*. *Genes Dev.* 22: 894-907 (2008).
227. Parsons D, Jones S, Zhang X, Lin J, Leary R, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam D, Tekleab H, Diaz L Jr, Hartigan J, Smith DR, Strausberg R, Marie S, Shinjo. An integrated genomic analysis of human glioblastoma. *Science* 321: 1807-1812 (2008).
228. Paulus W, Bayas A, Ott G, Roggendorf W. Interphase cytogenetics of glioblastoma and gliosarcoma. *Acta Neuropathol.* 88: 420-425 (1994).
229. Pazdur R, Coia L, Hoskins W, Wagman L. *Cancer Management: A Multidisciplinary Approach*. 10th Edition. San Francisco: UBM Medica US Editorial (2007).
230. Perry A, Aldape K, George D, Burger P. Small cell astrocytoma: an aggressive variant that is clinicopathologically and genetically distinct from anaplastic oligodendroglioma. *Cancer* 101: 2318-2326 (2004).
231. Phillips H, Kharbanda S, Chen R, Forrest W, Soriano R, Wu T, Misra A, Nigro J, Colman H, Soroceanu L, Williams P, Modrusan Z, Feuerstein BG, Aldape K. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* 9: 157-173 (2006).
232. Pichler M, Ressa A, Winter E, Stiegelbauer V, Karbiener M, Schwarzenbacher D, Scheideler M, Ivan C, Jahn SW, Kiesslich T, Gerger A, Bauernhofer T, Calin GA, Hoefler G. MiR-200a regulates epithelial to mesenchymal transition-related gene expression and determines prognosis in colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 110: 1614-1621 (2014).
233. Plate K, Breier G, Weich H, Mennel H, Risau W. Vascular endothelial growth factor and glioma angiogenesis: coordinate induction of VEGF receptors, distribution of VEGF protein and possible in vivo regulatory mechanisms. *Int J Cancer* 59: 520-529 (1994).
234. Plate KH, Risau W. Angiogenesis in malignant gliomas. *Glia* 15: 339-347 (1995).

235. Polivka J, Polivka J, Rohan V, Topolcan O, Ferda J. New molecularly targeted therapies for glioblastoma multiforme. *AntiCancer Res.* 32: 2935-2946 (2012).
236. Porter A. A Dead End: A Review of Glioblastoma. *Eukaryon* 8: 65-68 (2012).
237. Qin J, Wang Y, Jiang H, Xu J, Jiang Y, Wang Z. MicroRNA-145 suppresses cell migration and invasion by targeting paxillin in human colorectal cancer cells. *Int J Clin Exp Pathol.* 8: 1328–1340 (2015).
238. Qiu S, Huang D, Yin D, Li F, Li X, Kung HF, Peng Y. Suppression of tumorigenicity by microRNA-138 through inhibition of EZH2-CDK4/6-pRb-E2F1 signal loop in glioblastoma multiforme. *Biochim Biophys Acta* 1832: 1697-1707 (2013).
239. Ramaswamy S, Tamayo P, Rifkin R, Mukherjee S, Yeang C, Angelo M, Ladd C, Reich M, Latulippe E, Mesirov J, Poggio T, Gerald W, Loda M, Lander ES, Golub TR. Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures. *PNAS* 98: 15149-15154 (2001).
240. Rao R, James C. Altered molecular pathways in gliomas: an overview of clinically relevant issues. *Seminars Oncology* 31: 595-604 (2004).
241. Rao S, Arimappamagan A, Pandey P, Santosh V, Hegde A, Chandramouli B, Somasundaram K. miR-219-5p inhibits receptor tyrosine kinase pathway by targeting EGFR in glioblastoma. *PLoS One* 8: e631645 (2013).
242. Rao S, Edwards J, Joshi Ad, Siu M, Riggins G. A survey of glioblastoma genomic amplifications and deletions. *Neurooncol.* 96.2: 169-179 (2010).
243. Reifenberger G, Collins VP. Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas. *J Mol Med (Berl)* 82: 656-670 (2004).
244. Roldo C, Missiaglia E, Hagan JP, Falconi M, Capelli P, Bersani S, Calin GA, Volinia S, Liu CG, Scarpa A, Croce CM. MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior. *J Clin Oncol.* 24: 4677-4684 (2006).

245. Sato F, Kubota Y, Natsuzaka M, Maehara O, Hatanaka Y, Marukawa K, Terashita K, Suda G, Ohnishi S, Shimizu Y, Komatsu Y, Ohashi S, Kagawa S, Kinugasa H, Whelan KA, Nakagawa H, Sakamoto N. EGFR inhibitors prevent induction of cancer stem-like cells in esophageal squamous cell carcinoma by suppressing epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Biol Ther.* 16: 933-940 (2015).
246. Sathornsumetee S, Rich J. Designer therapies for glioblastoma multiforme. *Ann N Y Acad Sci.* 1142: 108-132 (2008).
247. Schönsteiner S, Bommer M, Haenle M, Klaus B, Scheuerle A, Schmid M, Mayer R. Rare phenomenon: liver metastases from glioblastoma multiforme. *J Clin Onco.* 29: 668-671(2011).
248. Schwartzbaum J, Fisher J, Aldape K, Wrensch M. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat Clin Pract Neurol.* 2: 494-503(2006).
249. Scott J, Suh J, Elson P, BRNAett G, Vogelbaum M, Peereboom D, Stevens G, Elinzano H, Chao S. Aggressive treatment is appropriate for glioblastoma multiforme patients 70 years old or older: a retrospective review of 206 cases. *Neuro Oncol.* 13: 428-436 (2011).
250. Serna E, Lopez C, Monleon D, Muñoz L, Callaghan R, Gil R, Martinetto H, Gregori A, Gonzalez J, Cerda M. Correlation between EGFR amplification and the expression of microRNA-200c in primary glioblastoma . *PLoS One* 9: 1-9 (2014).
251. Seok J, Lee S, Kim M, Lee Y. MicroRNA-382 induced by *HIF-1* is an angiogenic miR targeting the tumor suppressor phosphatase and tensin homolog. *Nucleic Acids Res.* 42: 8062-8072(2014).
252. Shaffer L. *ISCN: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature.* Basel: Karger (2013).
253. Shete S, Hosking F, Robertson L, Dobbins S, Sansom M, Malmer B, Simon M, Marie Y, Boisselier B, Delattre JY, Hoang-Xuan K, El Hallani S, Idbaih A, Zelenika D, Andersson U, Henriksson R, Bergenheim AT, Feychting M, Lönn S, Ahlbom A, Schramm J, Linneban. Genome-wide association study identifies five susceptibility loci for glioma. *Nat Genet.* 41: 899-904 (2009).

254. Shi Z, Wang J, Yan Z, You Y, Li C, Qian X, Yin Y, Zhao P, Wang Y, Wang X, Li M, Liu L, Liu N, Jiang B. MiR-128 inhibits tumor growth and angiogenesis by targeting p70S6K1. *PLoS One* 7: e32708 (2012).
255. 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).
256. Si ML, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, Mo YY. miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene* 26: 2799-2803 (2007).
257. Siebzehnruhl FA, Silver DJ, Tugertimur B, Deleyrolle LP, Siebzehnruhl D, Sarkisian MR, Devers KG, Yachnis AT, Kupper MD, Neal D, Nabils NH, Kladde MP, Suslov O, Brabletz S, Brabletz T, Reynolds BA, Steindler DA. The *ZEB1* pathway links glioblastoma initiation, invasion and chemoresistance. *EMBO Mol Med*. 5: 1196-1212 (2013).
258. Siker M, Wang M, Porter K, Nelson D F, Curran W J, Michalski J M, Souhami L, Chakravarti A, Yung W K, Delrowe J, Coughlin CT, Mehta MP. Age as an independent prognostic factor in patients with glioblastoma: a Radiation Therapy Oncology Group and American College of Surgeons National Cancer Data Base comparison. *Neurooncol*. 104: 351–356 (2011).
259. Silber J, Lim DA, Petritsch C, Persson A, Maunakea A, Yu M, Vandenberg S, Ginzinger D, James C, Costello J, Bergers G, Weiss W, Alvarez A, Hodgson J. miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. *BMC Med* 6: 14 (2008).
260. Simon M, Hosen I, Gousias K, Rachakonda S, Heidenreich B, Gessi M, Schramm J, Hemminki K, Waha A, Kumar R TERT promoter mutations: a novel independent prognostic factor in primary glioblastomas. *Neurooncol*. 17:45-52 (2014).
261. Singh M, Spoelstra N, Jean A, Howe E, Torkko K, Clark H, Darling D, Shroyer K, Horwitz K, Broaddus R, Richer J. *ZEB1* expression in type I vs type II endometrial cancers: a marker of aggressive disease. *Mod Pathol*. 21: 912-923 (2008).

262. Skalsky R, Cullen B. Reduced Expression of Brain-Enriched microRNAs in Glioblastomas Permits Targeted Regulation of a Cell Death. *PLoS One* 6: e24248 (2011).
263. Skiriute D, Vaitkiene P, Saferis V, Asmoniene V, Skauminas K, Pranas V, Tamasauskas A. MGMT, GATA6, CD81, DR4, and CASP8 gene promoter methylation in glioblastoma. *BMC Cancer* 12: 1471-1477 (2012).
264. Smith J, Tachibana I, Passe S, Huntley B, Borell T, Iturria N, O'Fallon J, Schaefer P, Scheithauer B, James C, Buckner J, Jenkins R. PTEN mutation, *EGFR* amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma. *J Natl Cancer Inst.* 93: 1246-1256 (2001).
265. Spoelstra N, Manning N, Higashi Y, Darling, D, Singh M, Shroye K, Broaddus R, Horwitz J. The transcription factor ZEB1 is aberrantly expressed in aggressive uterine cancers. *Cancer Res.* 66: 3893 – 3902 (2006).
266. Stojcheva N, Schechtmann G, Sass S, Roth P, Florea A, Stefanski A, Stühler K, Wolter M, Müller N, Theis F., Weller M, Reifenberger G, Happend C. MicroRNA-138 promotes acquired alkylator resistance in glioblastoma by targeting the Bcl-2-interacting mediator BIM. *Oncotarget* 7: 12937-12950 (2016).
267. Stott F, Bates S, James M, McConnell, B, Starborg, M, Brookes S, Palmero I, Ryan K, Hara E, Vousden K H, Peters G. The alternative product from the human *CDKN2A* locus, *p14(ARF)*, participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO* 17: 5001-5014 (1998).
268. Stupp R, Mason W, van den Bent M, Weller M, Fisher B, Taphoorn M, Belanger K, Brandes A, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer R, Ludwin S, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross J, Eisenhauer E, Mirimanoff R. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 352: 987-996 (2005).
269. Stuppia L, Antonucci I, Palka G, Gatta V. Use of the MLPA Assay in the Molecular Diagnosis of Gene Copy Number Alterations in Human Genetic Diseases. *Int J Mol Sci.* 13: 3245–3276(2012).

270. Su J, Zhang A, Shi Z, Ma F, Pu P, Wang T, Zhang J, Kang C, Zhang Q. MicroRNA-200a suppresses the Wnt/ β -catenin signaling pathway by interacting with β -catenin. *Int J Oncol.* 40: 1162-1170 (2012).
271. 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).
272. Suh S, Yoo J, Nuovo G, Jeon Y, Kim S, Lee T, Kim T, Bakacs A, Alder H, Kaur B, Aqeilan R, Pichiorri F, Croce C. MicroRNAs/TP53 feedback circuitry in glioblastoma . *PNAS* 109: 5316-5321 (2012).
273. Sun Y, Luo Z, Guo X, Su F, Liu X. An updated role of microRNA-124 in central nervous system disorders: a review. *Front Cell Neurosci.* 9:e193 (2015).
274. Tagawa H, Seto M. A microRNA cluster as a target of genomic amplification in malignant lymphoma. *Leukemia* 19: 2013-2016 (2005).
275. Tan H, He Q, Gong G, Wang Y, Li J, Wang J, Zhu D, Wu X. miR-382 inhibits migration and invasion by targeting ROR1 through regulating EMT in ovarian cancer. *Int J Oncol.* 48: 181-190 (2016).
276. Taylor B, Barretina J, Socci N, Decarolis P, Ladanyi M, Meyerson M, Singer S, Sander C. Functional copy-number alterations in cancer. *PLoS One* 3: e3179 (2008).
277. Taylor B, Ladanyi M. Clinical cancer genomics: how is now? *J Pathol.* 223:318- 326 (2011).
278. Tazawa H, Tsuchiya N, Izumiya M, Nakagama H. Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. *PNAS* 104: 15472-15477 (2007).
279. TCGA Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Difusse Glioma. *Cell* 164: 550-563 (2016).

280. TCGA. The Cancer Genome Atlas Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455: 1061-1068.(2008).
281. TCGA. The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. *Cell* 155: 462-477 (2013).
282. Thiel G, Losanowa T, Kintzel D, Nisch G, Martin H, Vorpahl K, Witkowski R. Karyotypes in 90 human gliomas. *Cancer Genet Cytogenet* 58:109-20 (1992).
283. Thiery J, Acloque H, Huang Y, Nieto M. Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell* 139: 871–890 (2009).
284. Thomas SM, Coppelli F, Wells A. Epidermal growth factor receptor-stimulated activation of phospholipase C gamma-1 promotes invasion of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 63: 5629-5632 (2003).
285. Thomson D, Bracken C, Szubert J, Goodal G. On Measuring miRNAs after Transient Transfection of Mimics or Antisense Inhibitors. *PLoS One* 8: e55214 (2013).
286. Tichy J, Spechtmeyer S, Hattingen E, Rieger J, Senft C, Foerch C. Prospective evaluation of serum glial fibrillary acidic protein (GFAP) as a diagnostic marker for glioblastoma. *J Neurooncol.* 126: 361–369 (2016).
287. Toledo F, Wah G. MDM2 and MDM4: p53 regulators as targets in anticancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol.* 39: 1476–1482 (2007).
288. Torp S. Diagnostic and prognostic role of Ki67 immunostaining in human astrocytomas using four different antibodies. *Clin Neuropathol.* 21: 252-257(2002).
289. Tryndyak VP, Beland FA, Pogribny IP. E-cadherin transcriptional down-regulation by epigenetic and microRNA-200 family alterations is related to mesenchymal and drug-resistant phenotypes in human breast cancer cells. *Int J Cancer* 126: 2575-2583 (2010).
290. Ulutin C, Fayda M, Aksu G, Cetinayak O, Kuzhan O, Ors F, Beyzadeousglu M. Primary Glioblastoma multiforme in younger patients: a single institution experience. *Tumori* 92: 407-411(2006).

291. Ungewiss C, Rizvi Z, Roybal J, Peng D, Gold K, Shin D, Creighton C, Gibbons D. The microRNA-200/Zeb1 axis regulates ECM-dependent β 1-integrin/FAK signaling, cancer cell invasion and metastasis through CRKL. *Sci Rep* 5: e18652 (2016).
292. Utsuki S, Sato Y, Oka H, Tsuchiya B, Suzuki S, Fujii K. Relationship between the expression of E-, N-cadherins and beta-catenin and tumor grade in astrocytomas. *J Neurooncol.* 5: 187-192 (2002).
293. Van Meir E, Hadjipanayis C, Norden A, Shu H, Wen P, Olson J. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA Cancer J Clin.* 6: 166-193 (2010).
294. Varela M, Ranuncolo S, Morand A, Lastiri J, De Kier Joffé E, Puricelli LI, Pallotta M. EGF-R and PDGF-R, but not bcl-2, overexpression predict overall survival in patients with low-grade astrocytomas. *J Surg Oncol.* 86: 34-40 (2004).
295. Vasudevan S, Tong Y, Steitz J. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation *Science* 318: 1931-1934 (2007).
296. Venturini L, Battmer K, Castoldi M, Schultheis B, Hochhaus A, Muckenthaler MU, Ganser A, Eder M, Scherr M. Expression of the miR-17-92 polycistron in chronic myeloid leukemia (CML) CD34+ cells. *Blood* 109: 4399-4405 (2007).
297. Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson M, Miller C, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O'Kelly M, Tamayo P, Weir BA, Gabriel S, Winckler W, Gupta S, Jakkula L, Feiler HS, Hodgson J, James C, Sarkaria J, Brennan C, K. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 17: 98-110 (2010).
298. Vinagre J, Almeida A, Populo H, Batista R, Lyra J, Pinto V, Coelho R, Celestino R, Prazeres H, Lima L. Frequency of TERT promoter mutations in human cancers. *Nat Commun.* 4:e2185 (2013).
299. Vogelstein B, Kinzler K. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10:789-99 (2004).

300. Vollmann A, Vornlocher H, Stempf T, Brockhoff G, Apfel R, Bogdahn U. Effective silencing of EGFR with RNAi demonstrates non-EGFR dependent proliferation of glioma cells. *Int J Oncol.* 28: 1531-1542 (2006).
301. Voorhoeve PM, le Sage C, Schrier M, Gillis AJ, Stoop H, Nagel R, Liu Y, van Duijse J, Drost J, Griekspoor A, Zlotorynski E, Yabuta N, De Vita G, Nojima H, Looijenga L, Agami R. A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Adv Exp Med Biol.* 604: 17-46 (2007).
302. Vordermark D, Ruprecht K, Rieckmann P, Roggendorf W, Vince G. Glioblastoma con componente oligodendrogial (GBO): resultado favorable después de post-operatorio la radioterapia y la quimioterapia con nimustine (ACNU) y teniposide (VM26). *BMC Cancer* 6: 247-249 (2006).
303. Vorstman J, Jalali G, Rappaport E, Hacker A, Scott C, Emanuel B. MLPA: a rapid, reliable, and sensitive method for detection and analysis of abnormalities of 22q. *Hum Mutat.* 27: 814-821 (2006).
304. Esquela A, Slack F. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer.*6:259-69 (2006).
305. Wang H, Wang H, Zhang W, Huang HJ, Liao WS, Fuller GN. Analysis of the activation status of Akt, NFkappaB, and Stat3 in human diffuse gliomas. *Lab Invest.* 84: 941-951 (2004).
306. Wang J, Chen J, Chang P, LeBlanc A, Li D, Abbruzzesse JL, Frazier ML, Killary AM, Sen S. MicroRNAs in plasma of pancreatic ductal adenocarcinoma patients as novel blood-based biomarkers of disease. *Cancer Prev Res (Phila)* 2: 807-813 (2009).
307. Wang Y, Li S, Chen L, You G, Bao Z, Yan W, Shi Z, Chen Y, Yao K, Zhang W, Kang C, Jiang T. Glioblastoma with an oligodendroglioma component: distinct clinical behavior, genetic alterations, and outcome. *Neuro Oncol.* 14: 518-525 (2012).
308. Wang X, Zheng M, Liu G, Xia W, McKeown P, Hung M, Zhao J. Kruppel-like factor 8 induces epithelial to mesenchymal transition and epithelial cell invasion. *Cancer Res.* 67: 7184 – 7193 (2007).

309. Watanabe T, Yokoo H, Yokoo M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Concurrent inactivation of RB1 and TP53 pathways in anaplastic oligodendrogliomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* 60: 1181-1189 (2001).
310. Weber K, Doucet M, Price J, Baker C, Kim S, Fidler I. Bloc-kade of epidermal growth factor receptor signaling leads to inhibition of renal cell carcinoma growth in the bone of nude mice. *Cancer Res.* 63: 2940-2947 (2003).
311. Wei Q, Clarke L, Scheidenhelm DK, Qian B, Tong A, Sabha N, Karim Z, Bock NA, Reti R, Swoboda R, Purev E, Lavoie JF, Bajenaru ML, Shannon P, Herlyn D, Kaplan D, Henkelman RM, Gutmann DH, Guha A. High-grade glioma formation results from postnatal *PTEN* loss or mutant epidermal growth factor receptor expression in a transgenic mouse glioma model. *Cancer Res.* 66: 7429-7437 (2006).
312. Welch C, Chen Y, Stallings R. MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells. *Oncogene* 26: 5017-5022 (2007).
313. Wick W, Platten M, Meisner C, Felsberg J, Tabatabai G, Simon M, Nikkhah G, Papsdorf K, Steinbach JP, Sabel M. Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 13:707–715 (2012).
314. Wiesener M, Münchenhagen P, Berger I, Morgan NV, Roigas J, Schwiertz A, Jürgensen J, Gruber G, Maxwell P, Löning S, Frei U, Maher E, Gröne H, Eckardt K. Constitutive activation of hypoxia-inducible genes related to overexpression of hypoxia-inducible factor-1alpha in clear cell renal carcinomas. *Cancer Res.* 61: 5215-5222 (2001).
315. Williams B. Treatment Options for Glioblastoma and other Gliomas. *Brain Life Newsletter* 7 (2008).
316. Wiltshire R, Herndon J, Lloyd A, Friedman H, Bigner D, Bigner S, McLendon R. Comparative genomic hibridation analysis of astrocytoma. Prognostic and and diagnostic implications. *J Mol Diagn.* 6: 166-179(2004).

317. Wrensch M, Jenkins RB, Chang JS, Yeh RF, Xiao Y, Decker PA, Ballman KV, Berger M, Buckner JC, Chang S, Giannini C, Halder C, Kollmeyer TM, Kosel ML, LaChance DH, McCoy L, O'Neill BP, Patoka J, Pico AR, Prados M, Quesenberry C, Rice T, Rynearson AL, Smirn. Variants in the *CDKN2B* and *RTEL1* regions are associated with high-grade glioma susceptibility. *Nat Genet.* 41: 905-908 (2009).
318. Wrobel G, Roerig P, Kokocinski F, Neben K, Hahn M, Reifenberger G and Lichter P. Microarray-based gene expression profiling of benign, atypical and anaplastic meningiomas identifies novel genes associated with meningioma progression. *Cancer* 114: 249-256 (2005).
319. Wu Z, Wu Y, Tian Y, Sun X, Liu J, Ren H, Liang C, Song L, Hu H, Wang L, Jiao B. Differential effects of miR-34c-3p and miR-34c-5p on the proliferation, apoptosis and invasion of glioma cells. *Oncol Lett.* 6: 1447-1452 (2013).
320. Wurdinger T, Costa FF. Molecular therapy in the microRNA era. *Pharmacogenomics J.* 7: 297-304 (2007).
321. Xu D, Ma P, Gao G, Gui Y, Niu X, Jin B. MicroRNA-383 expression regulates proliferation, migration, invasion, and apoptosis in human glioma cells. *Tumour Biol.* 36: 7743-7753 (2015).
322. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, Stephens RM, Okamoto A, Yokota J, Tanaka T, Calin GA, Liu CG, Croce CM, Harris CC. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 9: 189-98 (2006).
323. Yang X, Zhang L, Sun L, Li M. Epigenetic Regulation of miR-129-2 Leads to Overexpression of PDGFR α and FoxP1 in Glioma Cells. *Asian Pac J Cancer Prev.* 16: 6129-6133 (2015a).
324. Yang Y, Huang J, Zhang X, Shen L. MiR-129-2 functions as a tumor suppressor in glioma cells by targeting HMGB1 and is down-regulated by DNA methylation. *Mol Cell Biochem.* 404: 229-239 (2015b).
325. Yu J, Ohuchida K, Mizumoto K, Sato N, Kayashima T, Fujita H, Nakata K, Tanaka M. MicroRNA, hsa-miR-200c, is an independent prognostic factor in pancreatic cancer and its

upregulation inhibits pancreatic cancer invasion but increases cell proliferation. *Mol Cancer* 9: e169 (2010).

326. Yung WK, Albright RE, Olson J, Fredericks R, Fink K, Prados MD, Brada M, Spence A, Hohl RJ, Shapiro W, Glantz M, Greenberg H, Selker RG, Vick NA, Rampling R, Friedman H, Phillips P, Bruner J, Yue N, Osoba D, Zaknoen S, Levin VA. A phase II study of temozolomide vs. procarbazine in patients with glioblastoma at first relapse. *Br J Cancer* 83: 588-593 (2000).

327. Zagzag D, Friedlander D, Margolis B. Molecular events implicated in brain tumor angiogenesis and invasion. *Pediatr Neurosurg.* 33: 49-55 (2000).

328. Zha R, Guo W, Zhang Z, Qiu Z, Wang Q, Ding J, Huang S, Chen T, Gu J, Yao M, He X. Screening Identified That miR-134 Acts as a Metastasis Suppressor by Targeting Integrin b1 in Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One* 9: e87665 (2014).

329. Zhang H, Cai X, Wang Y, Tang H, Tong D, Ji F. microRNA-143, down-regulated in osteosarcoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity by targeting Bcl-2. *Oncol Rep.* 24: 1363-1369 (2010).

330. Zhang M, Zhang X, Bai C, Song X, Chen J, Gao L, Hu J, Hong Q, West M, Wei M. Silencing the epidermal growth factor receptor gene with RNAi may be developed as a potential therapy for non small cell lung cancer. *Genet Vaccines Ther* 3: e5 (2005).

331. Zhang N, Su Y, Xu L. Targeting PKC ϵ by miR-143 regulates cell apoptosis in lung cancer. *FEBS Letters* 587: 3661-3667 (2013).

332. Zhang Y, Chao T, Li R, Liu W, Chen Y, Yan X, Gong Y, Yin B, Liu W, Qiang B, Zhao J, Yuan J, Peng X. MicroRNA-128 inhibits glioma cells proliferation by targeting transcription factor E2F3a. *J Mol Med (Berl)* 87: 43-51 (2009).

333. Zhang Z, Liu Z, Ren W, Ye X, Zhang Y. The miR-200 family regulates the epithelial-mesenchymal transition induced by EGF/EGFR in anaplastic thyroid cancer cells. *Int J Mol Med.* 30: 856-862 (2012).

334. Zhi F, Chen X, Wang S, Xia X, Shi Y, Guan W, Shao N, Qu H, Yang C, Zhang Y, Wang Q, Wang R, Zen K, Zhang CY, Zhang

- J, Yang Y. The use of hsa-miR-21, hsa-miR-181b and hsa-miR-106a as prognostic indicators of astrocytoma. *Eur J Cancer* 46: 1640-1649 (2010).
335. Zhong J, Paul A, Kellie S, O'Neill G. Mesenchymal Migration as a Therapeutic Target in Glioblastoma. *J Oncol.* 3: 1-17 (2010).
336. Zhou X, Wang Y, Shan B, Han J, Zhu H, Lv Y, Fan X, Sang M, Liu XD, Liu W. The downregulation of miR-200c/141 promotes *ZEB1/2* expression and gastric cancer progression. *Med Oncol.* 32: e428 (2015)
337. Zhou B, Song J, Han T, Huang M, Jiang H, Qiao H, Shi J, Wang Y. MiR-382 inhibits cell growth and invasion by targeting *NR2F2* in colorectal cancer. *Mol Carcinogenesis* (2016).
338. Zhou X, Zhang J, Jia Q, Ren Y, Wang Y, Shi L, Liu N, Wang G, Pu P, You Y, Kang C. Reduction of miR-21 induces glioma cell apoptosis via activating caspase 9 and 3. *Oncol Rep.* 24: 195-201 (2010).
339. Zhu X, Zhang F, Zhang W, He J, Zhao Y, Chen X. Increased epidermal growth factor receptor gene copy number is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. *J Clin Oncol.* 24: 4170-4176 (2006).

8. APÉNDICE DOCUMENTAL

Apéndice I. Kits de MLPA

Tabla 1: Salsa MLPA KIT P105-D1 Gliomas-2. El kit contiene 55 sondas para MLPA con productos de amplificados de 126 a 500 nt. También tiene 9 controles que generan fragmentos de 120 nt.

Logitud (nt)	# de sonda del kit MLPA	Gen / Exon	Localizacion / sitio de Ligacion	Secuencia parcial (24nt adyacentes al sitio de ligación)
391	03107-L02038	PDGFRA, ex 3	NM_006206.4; 495-496	GGAGAGTGAAGT-GAGCTGGCAGTA
439	18756-L24124	PDGFRA, ex 5	NM_006206.4; 1042-1043	ACCTGTGCTGTT-TTTAACAATGAG
407	18755-L24123	PDGFRA, ex 22	NM_006206.4; 3263-3264	ATCCTGCTGTGG-CACGCATGCTGT
172 *	06405-L24605	EGFR, ex 1	NM_005228.3; 208-209	CCGTCCAGTATT-GATCGGGAGAGC
423 *	05435-L21568	EGFR, ex 2	NM_005228.3; 425-426	TAACGTGTAGGT-GGTCTTGGGAA
398 *	05436-L24070	EGFR, ex 3	NM_005228.3; 518-519	TTATGTCCTCAT-TGCCCTCAACAC
220	17208-L23059	EGFR, ex 4	NM_005228.3; 802-803	ACCACCTGGGCA-GCTGTAAGTGTCT
161 *	05438-L24607	EGFR, ex 5	NM_005228.3; 837-838	TGTCCCAATGGG-AGCTGCTGGGGT
137 ± *	06121-L20393	EGFR, ex 6	NM_005228.3; 899-900	CTGTGCCAGCA-GTGCTCCGGGCG
184 *	05440-L04856	EGFR, ex 7	NM_005228.3; 1102-1103	AGGGCAAATACA-GCTTTGTGTCCA
430 *	02063-L21569	EGFR, ex 8	NM_005228.3; 1200-1201	AGCTATGAGTG-GAGGAAGACGGC
256	05959-L24612	EGFR, ex 13	NM_005228.3; 1847-1848	CCGAGGCAGGGA-ATGCGTGGACAA
346 ±	17210-L24618	EGFR, ex 18	NM_005228.3; 2154-2155	CTTGAAAGCTGT-CCAACGAATGGG
269	05969-L24610	EGFR, ex 25	NM_005228.3; 3022-3023	AGATCTCCTCA-TCTTGGAGAAAG
309	17814-L22631	CDKN2A, ex 5	NM_000077.4; 1106-1107	TTGCGAGCTCG-CAGCCTCCGGAA
384	17817-L23295	CDKN2A, ex 3	NM_058195.3; 603-604	TGCGCGCGGCTG-CGGGGGGCACCA
250	16060-L22417	CDKN2A, ex 2a	NM_000077.4; 138-139	GCTTGGAAAGAT-ACCGGGCTCCCT
142	18753-L24594	CDKN2A, ex 1	NM_058195.3; 76 nt before ex 1	CGCAGGGCTCAG-AGCCGTTCCGAG
226	17387-L24118	PTEN, ex 1	NM_000314.4; 967-968	CCTGCAGAAGAA-GCCCCGCCACCA
190 *±	06729-L06339	PTEN, ex 2	NM_000314.4; 217nt after ex 2 rev.	TATCACATAAGT-ACCTGATTATGT
178	17314-L20922	PTEN, ex 3	NM_000314.4; 225nt after ex 3	TTGATCTGCTTT-AAATGACTTGGC
208	17391-L21278	PTEN, ex 4	NM_000314.4; 13nt before ex 4 rev.	AAAAGAAAAGTT-TAAAAGTGATAT
373 *	03638-L22839	PTEN, ex 5	NM_000314.4; 1436-1437	GGTGTAAATGATA-TGTGCATATTTA
323 *	03639-L24076	PTEN, ex 6	NM_000314.4; 1659-1658 rev.	CTTACTGCAAGT-TCCGCCACTGAA
475	17386-L22174	PTEN, ex 7	NM_000314.4; 1736-1737	ACACGACGGGAA-GACAAGTTCATG
359	17397-L24616	PTEN, ex 8	NM_000314.4; 1973-1974	AATGACAAGGAA-TATCTAGTACTT
214	07686-L15591	PTEN, ex 9	NM_000314.4; 3189-3188 rev.	ACAGCATCTGAA-TTTTAGCACTGG
454 «	18752-L22100	CDK4, ex 8	NM_000075.3; 1294-1295	TCTCTGAGGCTA-TGGAGGCTCCTC
339 «	17815-L22422	CDK4, ex 4	NM_000075.3; 781-782	GGCCTGGCCAGA-ATCTACAGCTAC
469	18710-L24620	MIR26A2, ex 1	NR_029847.1; 43-42	AGGCCTCACAGA-TGGAAACAGCCT
481	07178-L24069	MDM2, ex 3	NM_002392.3; 341-342	CCTACTGATGGT-GCTGTAAACCACC
415	18255-L22981	MDM2, ex 11	NM_002392.3; 1181-1180 rev.	TCAGGATCTTCT-TCAAATGAATCT
231	18757-L24608	NFKBIA, ex 5	NM_020529.2; 813-812 rev.	CTTCAACAGGAG-TGACACCAGGTC
277	18759-L24127	NFKBIA, ex 4	NM_020529.2; 711-712	GCATCGTGGAGC-TTTTGGTGTCTT
157	18758-L24126	NFKBIA, ex 3	NM_020529.2; 450-451	ATTCGTAGACTC-CACTCCACTTGG
445	17424-L24621	TP53, ex 11	NM_000546.5; 1360-1361	CTCATGTTCAAG-CCAGAAGGGCTC
353	17422-L24617	TP53, ex 10	NM_000546.5; 1248-1249	TGAGGCCTTGG-ACTCAAGGATGC
283 *±	01999-L21074	TP53, ex 7	NM_000546.5; 1041-1042	CTGTCTGGGAG-AGACCGGGGCAC
316	17421-L24613	TP53, ex 5	NM_000546.5; 795-796	TATCCGAGTGG-AGGAAATTTGCG
263 *±	02376-L21409	TP53, ex 4b	NM_000546.5; 606-607	CAAGATGTTTTG-CCAAGTGGCCAA
299	17420-L21142	TP53, ex 3	NM_000546.5; 511-510 rev.	TAGTGCCTTGG-TAGGTTTTCTGG
196 *	01996-L09268	TP53, ex 2a	NM_000546.5; 177-178	CTCTTGACAG-CCAGACTGCCTT
166 *	01588-L06028	TP53, ex 1	NM_000546.5; 118-119	TCCGGGGCACT-TTGCTTCCGGG

202	04542-L03931	SCN1A	2q24.3	AACACCACTTACCT-GGTGACAGGTTT
238	15174-L16949	RYBP	3p13	GAATCTTTCTGA-AATTGCACATGG
131	16316-L22397	RAB7A	3q21.3	CACAATAGGAGC-TGACTTTCTGAC
126	18709-L21698	IL4	5q31.1	ATCGACACCTAT-TAATGGGTCTCA
292	11900-L12706	PKHD1	6p12.2	TGCTCTCTGGAT-TCAAGACTGAAA
366	06760-L24615	CHD7	8q12.2	GATTTTTACCGT-GTGGTATCCACC
331	08905-L24614	MYBPC3	11p11.2	CGTGGGAGAGGA-CTCCTGCACAGT
148	14279-L15949	OCA2	15q13.1	AGGGGAAAATA-TCTCACCCCTTC
461	11674-L24181	HIRIP3	16p11.2	GGCGAGCCTCAA-AGGCAGTTGAGG
490	16456-L24172	MYO5B	18q21.1	TCTGACTCATCA-TCTCCCACTTCC
500	17001-L22947	SAMHD1	20q11.23	CCCTGTCACTC-AAGTTTGAGGAT
244	12431-L13432	LARGE	22q12.3	ATCCACCTGGTA-TGGTGCACGGGG

Tabla 2: Salsa MLPA KIT ME001-C2 Tumor suppressor -1. El kit contiene 26 sondas para MS-MLPA correspondientes a 24 genes supresores de tumores que generan productos de amplificación de 136 a 483 nt.

Logitud (nt)	# de sonda del kit MLPA	Gen / Exon	Localizacion / sitio de Ligacion	Secuencia parcial (24nt adyacentes al sitio de ligación)
---------------------	--------------------------------	-------------------	---	---

400 ±	04050-L01263	TP73	NM_005427.2; 12-13; 29790 nt before ATG	01-003.558977	CGCCCGGAAGGGGACGACG- GAAACCGGGGCCGCGCAGGCCAGCCGGGA
265	02761-L02210	CASP8	NM_001080125.1; 100 nt before exon 3	02-201.830871	CTTTCAATAAAGCATGTCCAGGCTC- GGGCTTTAGTTTGCACGTCCATGAATGTCTGCCACA
353 ±	03810-L01211	VHL	NM_000551.3; 134-135; 80 nt before ATG	03-010.158426	GCGAAGACTACGGAGGTGCACTGGG- AGCGCCACGACGCTCCGCCCGCTCCGACC
193 ±	04040-L01698	RARB	NM_000965.3; 253 nt before exon 1b	03-025.444559	CCGCCGCTTGTGGCTGCT- GCCTGCCTCTCTGGCTGTCTGCTTTTGGAGGCTGCT
167	01686-L01266	MLH1	NM_000249.3; 186-187; 13 nt before ATG	03-037.009621	CGTTGAGCATGTAGAGTTTCTCTGGCT- TCTGGGCCAAAATGCTGTTCTGGCAGGGTTATTCC
463 ±	02260-L01747	MLH1	NM_000249.3; 183 nt before exon 1, reverse; 382 nt before ATG	03-037.010000	CTGCTGAGGTGATCTGGCGGAGA- GCGGAGGAGGTGCTTGGCGTTCTCAGGCTCCTCCTCT
475	03984-L03251	CTNNB1	NM_001904.3; 351-352	03-041.241066	GGCTGTTAGTCACTGGCAGCAACA- GTCTTACCTGGACTTGGAAATCCATTCTGGTGCCACT
328	02248-L01734	RASSF1	NM_170714.1; 9 nt before exon 1; 141 nt before ATG	03-050.353298	CAGTCCCTGCACCCAGGTTTCCA- TTGGCGGCTCTCTCAGCTCCTCCCGCCGC
382	03807-L02159	RASSF1	NM_170714.1; 53-52, reverse; 79 nt before ATG	03-050.353347	GTCCACAGGGCGGGCCCGAC- TTCAGCGCTCCCCCAGGATCCAGA
409	02201-L01699	FHIT	NM_002012.2; 64 nt after exon 1	03-061.211918	CGCGGGTCTGGTTTCCACGC- GGCTCAGGTATCACCCCGGAGCCCACTGGG
483	02683-L02148	CASR	NM_000388.3; 2137-2138	03-123.485226	CCAGTGCTGTAACAAGTGCCACAGTACT- TCTGGTCCAATGAGAACCACACTCCTCGATTGCCAAGGA
148	01905-L01968	APC	NM_000038.5; 71 nt before exon 2	05-112.101357	CAGCTGTGTAATCCGCTGGATGCGGACC- AGGGCGTCCCACTCCCGTGGGAGCCCGC
373 ±	02202-L01700	ESR1	NM_001122742.1; 536-537; 163 nt after ATG	06-152.170883	CGCCCGCGTGTACAACATCCCGC- AGGGCGCGGCTACGAGTTCAACGCCGCGGC
154	03366-L02750	PARK2	NM_004562.2; 990-991	06-162.126766	CGTTCCAGCCCTCAACTTGGCTACT- CCCTCGCTTGTGGGTAAGTCTAGCATGTTTCTCTCAT
310	03184-L02523	CDK6	NM_001259.6; 1139-1140	07-092.085391	GCGTGATTGGACTCCAGGAGAAGAAGACT- GGCCTAGAGATGTTGCCCTTCCAGGCAGGCTTTTCA
161 ±	01524-L01744	CDKN2A	NM_058195.3; 829 nt before exon 1; 990 nt before ATG	09-021.985276	CAGAGGGGAAGAGGAAGAGGAAGAGCGCTCAGAT- GCTCCGGCTGCTGTAAGGTTAAACCAGAAAATAAAAT
211 ±	00607-L00591	CDKN2B	NM_078487.2; 470-471; 110 nt after ATG	09-021.998808	CTGCGACGCTCTGGAAGCCGG- CGCGGATCCCAACGGAGTCAACCGTTTCCGGGAGG

Apêndice documental

444	00678-L00124	CD27	NM_001242.4; 898-899; exon 6	12-006.430685	GAAAGTCCTGTGGAGCCTGCA-GAGCCTTGTCTGTACAGCTTGCCCAAGGGAGG
274	07949-L07730	CDKN1B	NM_004064.3; 316-317; 157 nt before ATG	12-012.761863	AGCCCCCTGCGGCTCTAGAGCTCGGGCCGTGGCTGTCTGGGGTCTGTGTCTTT
229	02334-L01820	PAH	NM_000277.1; 842-843	12-101.795401	CAGTGCCTGTGGTCCCAAGAA-CCATTCAAGAGCTGGACAGATTTGCCAATCAGATTCTCAG
238 ±±	03813-L03753	CHFR	NM_001161344.1; 116 nt before exon 1; reverse; 407 nt before ATG	12-131.974372	CGCGAGAGTAGGGCGGTGGAGG-AGCGCTCGGCCATCTTTGATCTTGACACAGGCGGACTTCGT
301 ±	04042-L03755	BRCA2	NM_000059.3; 130-131; 852 nt before ATG	13-031.787722	CGGGAGAAGCGTGAGGGGACAGATTTGTG-CCGGCGCGGTTTTTGTACAGCTTACTCCGGCCAAAAAGAA
418	01617-L01199	BRCA2	NM_000059.3; 9100-9101	13-031.851548	GGCCATGGAATCTGCTGAACAAAA-GGAACAAGSTTTATCAAGGGATGTCAACAACCGTGTGGAGTTGCG
202	01245-L00793	MLH3	NM_001040108.1; 3553-3554	14-074.578836	GCGACCTTGTCTTCTTCCCTTCCGAGAGCTCGAGCAGAGAGGACTGTGATGAGACAGGATAACAG
281	01832-L01397	TSC2	NM_000548.3; 2080-2081	16-002.061786	GAGCCAGAGAGAGGCTCTGAGAAGAAG-ACCAGCGGCCCTTCTCTCCACAGGGCTCTGCTATGAAGGAAGCGTTCCGAAGCTGCTAGTCTGAGCTCCCTGAACCTCTCAGAGTCAGACAAAGAC CAGGAC
436 ±±	07946-L07727	CDH13	NM_001220491.1; 344-345; 42 nt after ATG	16-081.218219	TTCTGTGCGTCTCTCTGTCCAG-GTAGGGAAGAGGGGCTGCCGGCGCGCTCTG
220 ±	03804-L00949	HIC1	NM_006497.3; 11 nt before exon 1	17-001.905107	CCGCTCCAGATAAGAGTGTGCGGA-AAGCGCGCGGGGCTGAGACGCGACCAAGGAC
246 ±	05162-L04543	BRCA1	NM_007294.3; 178-179	17-038.530811	TTCTCAGATAACTGGGCCCTTGC-GCTCAGGAGGCTTCAACCTCTGCTCTGGGTAAGG
256	00587-L00382	BCL2	NM_000633.2; 1151-1152	18-058.946868	CTTCTCTGGCTGTCTCTGAAGACTC-TGCTCAGTTTGGCCCTGGTGGAGCTTG
390	00713-L00108	KLK3	NM_001648.2; 53-54	19-056.050014	TGTGTCCATGTGGGTCCCG-GTTGTCTCTCACCCCTGTCCGTGACGTGGA
142	02255-L03752	TIMP3	NM_000362.4; 1015-1016; 172 nt before ATG	22-031.527795	TCCAGCGCGGAGGCAGCTCGC-TGCGGCCATCCCGTCCCGCGGGCAGCTCGG

Apéndice II. Estadística

Tabla 1. Parámetros clínicos. Media aritmética para cada uno de los tres grupos y p-valor del test de Kruskal-Wallis.

Variable	N_amp	L_amp	H_amp	p_valor
Edad (años)	60.31	49.5	61.6	0.217
IK	84.38	79	70.5	0.001
DSI (días)	11.31	13.1	13.42	0.956
Tamaño (cm)	3.16	3.67	4.17	0.364
Evolución (meses)	14.33	13.29	12.4	0.914
Ki67 (%)	8.7	14.38	20.31	0.01

Tabla 2. Frecuencia relativa en tantos por ciento, de diferentes categorías, en cada uno de los tres grupos y p-valor del test Chi-cuadrado.

Variable	N-.amp	L- amp	H-amp	p_valor
Sexo	31.2	20	50	0.232
CEP7_trisomias	93.8	90	100	0.403
CEP7_polisomias	31.2	90	35	0.006

Tabla 3. Frecuencia relativa de las alteraciones génicas, en tantos por ciento, en cada uno de los tres grupos, y p-valor del test Chi-cuadrado.

Gen	N-amp	L-amp	H-amp	p_valor
<i>EGFR</i>	0	100	100	0,001
<i>PTEN</i>	25	50	45	0.345
<i>MDM2</i>	25	10	25	0.596
<i>CDK4</i>	12.5	10	15	0.926
<i>TP53</i>	37.5	20	25	0.573
<i>NFKBIA</i>	18.8	10	15	0.833
<i>MIR26A2</i>	6.2	0	0	0.384
<i>OCA2</i>	0	20	30	0.06
<i>SAMHD1</i>	25	40	30	0.72
<i>MYBPC3</i>	25	20	45	0.28
<i>LARGE</i>	6.2	30	55	0.008

Tabla 4. Frecuencia relativa de las alteraciones génicas, en tantos por ciento, en cada uno de los tres grupos y p-valor del test Chi-cuadrado.

Gen	N-amp	L-amp	H-amp	p_valor
<i>CDKN2A</i>	33.3	40	78.9	0.017
<i>CDKN2B</i>	33.3	40	73.7	0.044
<i>VHL</i>	26.7	40	36.8	0.746
<i>GSTP1</i>	33.3	30	31.6	0.984
<i>CASP8</i>	6.7	10	10.5	0.921
<i>FHIT</i>	6.7	20	10.5	0.582
<i>APC</i>	6.7	10	10.5	0.921
<i>CDH13</i>	6.7	30	5.3	0.107
<i>TIMP3</i>	6.7	10	10.5	0.921
<i>BRCA1</i>	0	0	10.5	0.252
<i>AI651963</i>	33.3	40	42.1	0.868
<i>CREM</i>	26.7	40	36.8	0.746
<i>CDH1</i>	33.3	50	31.6	0.591
<i>PAH</i>	6.7	50	21.1	0.039
<i>BCL2</i>	6.7	40	15.8	0.1
<i>PARK2</i>	0	10	26.3	0.079
<i>BRCA2</i>	20	10	10.5	0.676
<i>CD27</i>	13.3	10	15.8	0.91
<i>MLH3</i>	0	20	15.8	0.219

Apéndice III. Resultados de los miRNAs

Tabla 1. Fold change y la significación estadística de los valores de $p \leq 0,05$ para los pequeños RNAs no codificantes expresados diferencialmente entre los grupo H-amp y N- amp. Los miRNAs etiquetados en negro son comunes al modelo PLS-DA.

EGFR-ampH vs EGFR-Namp Probeset ID	P-value	Fold Change
hsa-miR-200c_st	4.86E-04	-3.84
U42A_st	1.02E-03	1.44
hsa-miR-891a_st	1.06E-03	-6.89
U57_st	1.90E-03	1.41
hsa-miR-299-5p_st	2.92E-03	-2.34
ENSG00000199363_st	3.12E-03	-1.28
hsa-miR-138_st	3.49E-03	-3.47
U98b_x_st	3.59E-03	-1.30
hsa-miR-193a-3p_st	3.64E-03	-2.05
14qII-22_x_st	4.16E-03	-2.00
ENSG00000201863_st	4.41E-03	-1.26
hsa-miR-129-5p_st	4.58E-03	-2.99
hsa-miR-491-5p_st	4.64E-03	-2.03
hsa-miR-320b_st	5.10E-03	1.49
14qI-6_st	5.13E-03	-1.44
hsa-miR-892b_st	5.68E-03	-2.75
ENSG00000212401_x_st	6.33E-03	-1.20
hsa-miR-200a_st	6.43E-03	-1.84
U102_st	6.75E-03	1.30
hsa-miR-586_st	6.86E-03	-1.28
hsa-miR-320c_st	7.01E-03	1.42
hsa-miR-320d_st	7.21E-03	1.50
hsa-miR-569_st	7.33E-03	-1.41
hsa-miR-32_st	7.35E-03	1.27

hsa-miR-496_st	7.53E-03	1.27
hsa-miR-320a_st	8.20E-03	1.48
hsa-miR-128_st	8.37E-03	-2.54
hsa-miR-124_st	8.69E-03	-4.64
hsa-miR-193a-5p_st	8.92E-03	-1.84
ENSG00000199552_x_st	9.70E-03	1.20
ENSG00000201859_x_st	1.09E-02	1.18
spike_in-control-1_st	1.14E-02	1.21
ACA29_st	1.21E-02	1.27
ENSG00000199282_st	1.22E-02	1.25
14qII-28_x_st	1.25E-02	-1.97
U71b_x_st	1.28E-02	1.26
ENSG00000212529_st	1.30E-02	-1.26
hsa-miR-876-3p_st	1.31E-02	1.29
ENSG00000212338_x_st	1.57E-02	1.35
U56_st	1.73E-02	1.50
hsa-miR-1292_st	1.76E-02	1.29
hsa-miR-106a-star_st	1.91E-02	1.48
hsa-miR-570_st	1.97E-02	1.22
14qII-26_st	2.00E-02	-2.63
hsa-miR-1228_st	2.01E-02	1.66
hsa-miR-379_st	2.08E-02	-3.56
U78_x_st	2.11E-02	1.47
ENSG00000201810_st	2.12E-02	1.17
hsa-miR-767-3p_st	2.15E-02	1.38
hsa-miR-363_st	2.16E-02	-1.60
hsa-miR-132_st	2.22E-02	-1.61
hsa-miR-34c-3p_st	2.30E-02	-1.91
ENSG00000207244_st	2.34E-02	1.19
14qII-26_x_st	2.44E-02	-2.25
14qII-31_st	2.48E-02	-1.23
hsa-miR-523-star_st	2.81E-02	-1.22
14qI-9_x_st	2.84E-02	-1.60
hsa-miR-675_st	2.89E-02	1.42
hsa-miR-485-3p_st	2.90E-02	-1.97

ENSG00000206961_st	3.02E-02	-1.19
ENSG00000199633_st	3.06E-02	1.16
hsa-miR-31_st	3.07E-02	-3.92
hsa-miR-383_st	3.20E-02	-3.47
ENSG00000200051_x_st	3.24E-02	-1.13
hsa-miR-654-3p_st	3.35E-02	-1.83
hsa-miR-571_st	3.40E-02	1.22
hsa-miR-154_st	3.40E-02	-2.24
hsa-miR-601_st	3.46E-02	-1.29
ENSG00000200072_st	3.48E-02	1.26
hsa-miR-148a-star_st	3.50E-02	-1.41
U41_st	3.52E-02	1.35
U58B_x_st	3.63E-02	1.25
hsa-miR-139-5p_st	3.68E-02	-2.38
ENSG00000202517_st	3.72E-02	1.19
hsa-miR-326_st	3.99E-02	-1.36
hsa-miR-624_st	4.03E-02	1.25
hsa-miR-205_st	4.08E-02	-3.23
ENSG00000201674_x_st	4.09E-02	1.15
hsa-miR-342-3p_st	4.13E-02	-1.37
ENSG00000200999_x_st	4.17E-02	-1.23
hsa-miR-433_st	4.21E-02	-2.58
hsa-miR-375_st	4.30E-02	-1.41
ENSG00000200288_x_st	4.32E-02	-1.19
ENSG00000212295_st	4.35E-02	-1.17
hsa-miR-1257_st	4.35E-02	-1.41
ENSG00000206903_x_st	4.37E-02	-1.13
hsa-miR-377-star_st	4.41E-02	-1.72
ENSG00000201300_x_st	4.47E-02	-1.31
ENSG00000207199_x_st	4.47E-02	1.15
ENSG00000200394_x_st	4.50E-02	1.36
HBII-85-5_x_st	4.52E-02	1.26
ENSG00000212214_st	4.57E-02	-1.19
hsa-miR-548p_st	4.58E-02	1.23
ENSG00000212295_x_st	4.61E-02	1.20

Apéndice documental

hsa-miR-134_st	4.62E-02	-2.46
hsa-miR-588_st	4.65E-02	1.16
ENSG00000212161_st	4.69E-02	1.19
hsa-miR-944_st	4.87E-02	-1.26
hsa-miR-203_st	4.88E-02	-1.71
14qI-3_x_st	4.92E-02	-1.27
ENSG00000212434_st	4.95E-02	1.18
ENSG00000199850_x_st	4.98E-02	-1.18

Apéndice 4. Caracterización de los genes estudiados

Tabla 1. Características de los genes del kit Salsa MLPA KIT ME001-C2 Tumor suppressor -1.

GEN	FUNCIÓN	TUMORES	PROCESOS IMPLICADOS
<i>TP73</i>	Codifica para una proteína miembro de la familia de p73 de factores de transcripción.	Neuroblastoma	Vía de P73
<i>CASP8</i>	Codifica para una proteasa de la familia de las cisteína-acidoaspartato (caspasas).	cáncer gástrico, colon, mama	Apoptosis
<i>VHL</i>	Codifica para una proteína que es un componente de un complejo proteico que incluye elongina B, elongina C, y culina-2.	Sd Von-Hippel-Lindau, carcinoma renal de células claras, feocromocitoma, eritrocitosis	Ubiquitinización de HIF.

Apéndice documental

<i>RARB</i>	Codifica para un receptor hormonal en el núcleo que se une al ácido retinoico y media el crecimiento celular a través de la regulación de la transcripción.	Carcinoma hepatocelular, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón microcítico	Metabolismo de los carotenos y de la vitamina A.
<i>MLH1</i>	Es un homólogo humano del gen <i>mutL</i> de reparación de los desajustes de DNA de la <i>E.coli</i> .	Cáncer de colon hereditario, cáncer de mama	Reparación del DNA
<i>CTNNB1</i>	Codifica para proteínas de uniones adherentes y también esta proteína se une a productos del gen <i>APC</i> .	Cancer colorectal, meduloblastoma y cáncer de ovario	Proteínas de uniones adherentes y via APC
<i>RASFF1</i>	Codifica para una proteína similar a las proteínas efectoras RAS	Carcinoma escamoso de esófago, cáncer de ovario, cáncer de mama	Reparación del DNA, arresto celular, hipermetilación de regiones promotoras.

Apéndice documental

<i>FHIT</i>	Este gen engloba el sitio común frágil FRA3B en el cromosoma 3, donde el daño carcinogénico inducido puede conducir a traslocaciones y transcritos aberrantes que se han encontrado en diferentes cánceres	Cáncer de esófago, estómago y colon	Metabolismo de purinas
<i>CASR</i>	Codifica para un receptor acoplado a una proteína G que se expresa en glándula paratiroides y túbulo renal. Es sensible a pequeños cambios del Ca circulante y juega un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis mineral.	Cancer de mama, colorectal	Señalización a través de proteínas G
<i>APC</i>	Este gen tiene una proteína supresora tumoral que actúa como antagonista de la vía de señalización de Wnt.	FAP (Poliposis Adenomatosa Familiar)	Vía de señalización de Wnt. Procesos de migración y adhesión celular, activación de la transcripción y apoptosis
<i>ESR1</i>	Receptor de estrógenos en el núcleo importante para la unión a hormonas, unión a DNA, activación y transcripción, que intervienen en las funciones de desarrollo sexual y función reproductiva.	Cáncer de mama, cáncer de ovario, osteoporosis	Vía de señalización de estrógenos; vía de regulación de la reabsorción de Calcio; red de transcripción FOXA1
<i>PARK2</i>	Función exacta desconocida. Es un componente del complejo de multiproteínas E3 ubiquitina-ligasa, que media la focalización de sustratos proteicos por la degradación en	Enfermedad de Parkinson, cáncer de pulmón, cáncer de ovario	Sistema inmune adaptativo; vía de señalización de alfa-sinucleína; procesamiento de antígeno para degradación por proteasoma y ubiquitinización; procesamiento de

Apéndice documental

	proteasoma		antígeno para MHC I; vía parkin-ubiquitina proteasoma; procesamiento proteico en RE; proteólisis mediada por ubiquitina
<i>CDK6</i>	Esta kinasa fosforila y esto regula la actividad de la proteína supresora tumoral Rb	Leucemia mieloide aguda, cáncer de esófago de células escamosas	Fase G1 del ciclo celular y transición G1/S
<i>CDKN2A</i>	Genera diferentes transcritos, dependiendo de por donde se corte, dando lugar a diferentes isoformas.	Cáncer de mama, carcinoma cel escamosas cabeza y cuello, leucemialinfoblástica T, cáncer de páncreas,	Pc3 y CDK4. Fase G1 ciclo celular.
<i>CDKN2B</i>	Este gen codifica para una quinasa ciclin-dependiente inhibidora	Leucemia mieloide, glaucoma	Vía de CDK4, CDK6, fase G1 ciclo celular
<i>DAPK1</i>	Esta quinasa es un mediador positivo del interferon-gamma que induce muerte celular programada. Es un candidato de supresor tumoral	Cáncer bucal, cáncer de ovario, cáncer de cérvix	Vía de la apoptosis, vía de IFN-gamma
<i>CUGBP2</i>	Regulación de splicing alternativo del pre-mRNA, edición mRNA y translación	Cáncer de colon, cáncer de mama	Pre-mRNAsplicing
<i>CREM</i>	Codifica para proteínas que actúan como activadores y represores de la transcripción y es un importante componente de la respuesta del AMPc	Carcinoma escamoso de esófago,	Vía activación AMPc
<i>PTEN</i>	Este gen codifica para una fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-	Cancer de colontumores pancreáticos	Vía AKT. VíaWnt

Apéndice documental

	fosfatasa, lo que hace es desfosforilar los sustratos	neuroendocrinos, carcinoma hepatocelular	
<i>CD44</i>	Codifica para una glicoproteína de la superficie celular. Interviene en la activación de linfocitos, recirculación, hematopoyesis y metástasis tumoral	Cáncer de vejiga, cáncer de mama, leucemia aguda	Interacción membranas, señalización citoquinas en el sistema inmune, linaje celular hematopoyético, degradación matriz extracelular, vía del interferón, metabolismo del hialurónico, etc
<i>GSTP1</i>	Detoxificación mediante la catalización de la conjugación de componentes hidrofóbicos y electrolíticos con glutatión reducido	Cáncer de mama, tumor de ovario	Conjugación del glutatión, metabolismo xenobióticos mediante p450, vía araquidónico-epoxigenasa/epóxido hidrolasa, respuesta celular al estrés, carcinogénesis química.
<i>ATM</i>	Controlador de puntos dentro del ciclo celular Regulador a la baja de supresores tumorales como p53 y BRCA1, punto de control celular de la kinasa CHK2, punto de control de RAD17 y RAD9, proteína NBS1 de reparación de DNA	Cáncer de pulmón, ataxia	Ciclo celular, fosforilación de reparación de proteínas, rotura de doble hebra de DNA, apoptosis, autodegradación de E3 ubiquitina ligasa COP1, respuesta celular a estrés.
<i>IGSF4/CADM1</i>	Adhesión celular de mastocitos	Glioblastoma, enfisema pulmonar	Adhesión de moléculas, comunicación célula-célula
<i>TNFRSF1A</i>	Receptor TNF. Puede activar NF-kappaB, mediar apoptosis, regulación de la inflamación.	Cáncer gástrico, Síndrome de fiebre periódica, Alzheimer	Apoptosis, vía NF-kappaB, vía de señalización de adipocitos
<i>TNFRSF7CD27</i>	Inmunidad células T, este receptor se	Carcinoma hepatocelular,	Receptor de interacción citoquina-

Apéndice documental

	liga con CD70 y regula la activación de las células B y la síntesis de Igs y también tiene función en la apoptosis.	linfoma difuso de células B	citoquina, NF-kappaB, MAPK8/JNK
<i>CDNK1B</i>	Control de que el ciclo celular pase a G1 y la degradación de su proteína es necesaria para que la célula pase de un estado quiescente a proliferativo	MEN4, cáncer de mama, linfoma linfoblástico de células B, colangiocarcinoma	Ciclo celular, vía PI3K/AKT.
<i>CHFR</i>	Punto de control del ciclo celular que regula la entrada de la mitosis.	Adenocarcinoma pulmón, cáncer endometrial	Punto control de la mitosis
<i>BRCA2</i>	Mantiene la estabilidad del genoma, especialmente de las vías de recombinación de homólogos para el reparto del DNA de doble cadena.	Cáncer de mama, ovario, glioma, meduloblastoma, cáncer de páncreas.	Reparación DNA y mantienen estabilidad genómica.
<i>MLH3</i>	Reparación de los desajustes del DNA	Cáncer colorectal no poliposico tipo 7 (HNPCC7)	Replicación DNA, recombinación meiótica
<i>TSC2</i>	Estimula GTPasas específicas. La proteína actúa como una chaperona de la hamartina	Esclerosis tuberosa	Via AMPK, interacciones DAP12, vía PI3K/AKT, SI adaptativo, efectores directos de p53
<i>CDH1</i>	Es una cadherina de la superfamilia de las caderinas.	Carcinoma endometrial, cáncer de ovario, mama, cáncer gástrico hereditario, tumor maligno de próstata, tiroides	Adhesión celular
<i>CDH13</i>	Superfamilia de las caderinas	Glioma, melanoma, desórdenes cardiometabólicos	Diferenciación celular

Apéndice documental

<i>HIC1</i>	Regulación del crecimiento y gen supresor tumoral.	Tumor de células renales, cáncer gástrico	Regulación crecimiento
<i>BCL2</i>	Codifica para una proteína de la membrana mitocondrial, que bloquea la apoptosis.	Linfoma folicular, cáncer de mama, leucemia linfoblástica en niños	Apoptosis
<i>KLK3</i>	Codifica para una proteasa que se encuentra en el líquido seminal cuya función es licuar el coagulo seminal.	Cáncer de próstata	Vía de señalización de los andrógenos, factor de transcripción FOXA1
<i>TIMP3</i>	Las proteínas codificadas por este gen, son inhibidores de las metaloproteinasas.	Carcinoma endometriode, adenocarcinoma unión gastroesofágica.	Matriz extracelular

Apéndice documental

Tabla 2. Características de los genes más implicados en los perfiles genéticos de los grupos de amplificación de *EGFR*

GEN	NOMBRE	LOCALIZ.	FUNCION	TUMORES	PROCESOS IMPLICADOS
<i>CDKN2A</i>	Kinasa inhibidora dependiente de ciclina 2A	9p21	Participa en la unión de los factores de transcripción, unión a proteínas inhibidoras de la actividad de transferasas	Melanoma, carcinoma de páncreas, cáncer de mama, cáncer pancreático, paragangliomas	Ciclo celular, senescencia celular, apoptosis, regulación en el crecimiento celular, regulación de la proliferación celular
<i>CDKN2B</i>	Quinasa inhibidora dependiente de ciclina 2B	12p13.1	Inhibidor de la actividad kinasa dependiente de ciclina.	Cáncer de esófago, melanomas, hepatoblastoma, carcinoma.	Ciclo celular, expresión de genes, transcripción, diferenciación
<i>CDH1</i>	Caderina1	16q22.1	Adhesión celular, unión de proteínas.	Cáncer de colon, cáncer pancreático	Apoptosis, unión célula-célula, desestabilización de la matriz extracelular, desarrollo neuronal, sinapsis.
<i>GSTP1</i>	Glutación transferasa P1	11q13.2	Catalización de la conjugación de componentes hidrofóbicos y electrolíticos con glutatión reducido.	Cáncer de mama, cáncer, colorectal, adenocarcinoma, cáncer de próstata, cáncer de esófago	Adhesión célula-matriz, desarrollo del SNC, regulación vía MAPK, apoptosis, necrosis.

Apéndice documental

<i>PTEN</i>	Homólogo de fosfatasa y tensina	10q23.3	Codifica para una proteína supresora de tumores	Carcinomas, cancer de ovario, de colon, tumores cerebrales	Crecimiento y proliferación celular, apoptosis, angiogenesis, migración, metabolismo.
<i>SAMHDI</i>	Dominos SAM y HD que contiene desoxinucleósido trifosfato hidrolasa 1	20q12	Enzima que exhibe actividad fosfohidrolasa, la conversión de trifosfatos de nucleótidos a trifosfato y un nucleósido	Colon, pulmón, páncreas, mama y cáncer colorectal	Replicación del VIH en las células dendríticas, macrófagos y monocitos. Proliferación de células neoplásicas.
<i>VHL</i>	Von Hippel Lindau	3p25.3	Unión de proteínas, factor de transcripción, actividad ubiquitina ligasa	Cáncer de riñón, carcinomas, hemangioblastomas	Morfogénesis celular, Respuesta celular a la hipoxia, apoptosis, proliferación celular, transcripción, Diferenciación, proteólisis, Angiogénesis.
<i>CREM</i>	Elemento de respuesta modulador CAMP/CREM	10p11.21	Codifica el factor de transcripción bZIP que se une al elemento de respuesta cAMP que se encuentra en muchos promotores celulares. Es un componente importante de la transducción de	Carcinomas	Activador o como represor de la transcripción. Baja expresión incrementa la invasión y la migración en carcinomas.

Apéndice documental

			señales mediada por AMPc		
<i>LARGE</i>	Glicosiltransferasa LARGE	22q12.3	Codifica una glicosiltransferasa que participa en la síntesis de glicoproteínas y glicosfingolípidos	Meningiomas	Reordenamientos genómicos específicos de tumores. Implicado en el desarrollo y progresión tumoral.
<i>TP53</i>	Proteína tumoral P53	17p13.1	Codifica para una proteína supresora de tumores	carcinomas, astrocitomas, glioblastomas, meduloblastomas, cáncer de mama, leucemia, neuroblastoma	Control del ciclo celular, Apoptosis, senescencia, reparación del DNA, metabolismo, diferenciación y proliferación celular.
<i>MYBPC3</i>	Codifica miosina cardíaca	11p11.2	cMyBP-C regula el posicionamiento de la miosina y la actina y participa en la contracción del musculo cardíaco		Mantenimiento de la función cardíaca normal. La ausencia de cMyBP-C da lugar a la hipertrofia cardíaca severa.

Apéndice documental

<i>OCA2</i>	Albinismo oculocutáneo II	15q	Este gen codifica una proteína de membrana que participan en el transporte de moléculas pequeñas, específicamente la tirosina, que es un precursor para la síntesis de melanina.	Melanoma	Las mutaciones en el gen <i>OCA2</i> causa una interrupción en la producción normal de melanina; por lo tanto, generan problemas de visión y las reducciones en el cabello, la piel y el color de ojos.
<i>MDM2</i>	Murine doble minute 2	12q14.3-q15	Actúa como una ubiquitina ligasa E3 Y y como inhibidor de la activación transcripcional de p53.	Sarcomas, gliomas, osteosarcoma, retinoblastoma, cáncer de páncreas y renal	Regulador positivo de la proliferación celular, apoptosis, ciclo celular.
<i>PAH</i>	Fenilalanina hidroxilasa	12q23.2	Unión de aminoácidos, unión de cofactor	Hepatoma, cáncer de próstata	Redox, procesos catabólicos, neurotransmisión.
<i>BCL2</i>	Células B Linfoma 2	18q21.33	Unión de proteínas, factor de transcripción.	Melanoma, linfoma, leucemia	Proliferación de células B, Diferenciación células T, apoptosis, regeneración del axon, crecimiento celular, respuesta celular en hipoxia, respuesta frente a virus.

