

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



TESIS DOCTORAL

**Identificación de marcadores pronósticos y diagnósticos en
meningiomas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Elisa Pérez Magán

Directora

Bárbara Meléndez Asensio

Madrid, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD CIENCIAS BIOLÓGICAS

DPTO. BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



**IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES PRONÓSTICOS Y
DIAGNÓSTICOS EN MENINGIOMAS**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Dpto. de BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID**

**IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES PRONÓSTICOS Y DIAGNÓSTICOS EN
MENINGIOMAS**

TESIS DOCTORAL

Doctorando:

Elisa Pérez Magán

Directora:

Bárbara Meléndez Asensio

Tutora:

M^a Resurrección García Gutiérrez

Agradecimientos

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias al apoyo, ánimo y colaboración de muchas personas a las que me gustaría mostrarles mi agradecimiento.

En primer, quería agradecer a mi Directora de Tesis, Bárbara Meléndez, por la oportunidad de trabajar en este tema, por su apoyo y comprensión y por los conocimientos que me ha transmitido en estos años.

Especialmente, quiero agradecer a la Dra. Manuela Mollejo su gran apoyo y ánimo, sus enseñanzas y su gran ayuda a la hora de realizar esta Tesis.

Al Dr. Ángel Rodríguez de Lope, Neurocirujano en el Hospital Puerta de Hierro, su gran apoyo y ayuda y sobretodo su gran entusiasmo y optimismo en la realización de este trabajo.

Me gustaría agradecer a la Tutora de esta Tesis, M^a Resurrección García, la ayuda prestada. Y en especial al profesor Guillermo Velasco, por su inestimable ayuda en los últimos pasos.

A Pedro Martínez, como jefe de la Unidad de Genética del Hospital Virgen de la Salud, por haberme permitido desarrollar mi trabajo en este laboratorio de Genética Molecular, y a todos los compañeros que forman o han formado parte de él, Patricia, Carles, Marisol, Pedrulo, Paco, Fermina, Chelo, y Ali. En especial, quería agradecer a las Técnicas, Sonsoles, Vane y Noe, esos desayunos especiales, no hubiera sido igual sin ellos, y a Gema y Carmen, quería agradecerles su gran ayuda y esas tardes tan divertidas, después de eso nada será igual.

A todas las personas que trabajan en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Virgen de la Salud de Toledo. A todos ellos, muchas gracias.

A las patólogas Concha Fiaño del Hospital Xeral-Cíes de Vigo y Teresa Ribalta del Hospital Clinic de Barcelona.

También quería dar las gracias a dos personas muy especiales para mí, Yoli Campos y Elena, por toda su ayuda, su apoyo, su ánimo y sus risas en los buenos y malos momentos. También a mi compañera y amiga Yoli R., mi “medio dedo”, sabes que sin ti no habría podido, muchas gracias por estar ahí.

Me gustaría dedicar esta tesis y agradecer esta Tesis a mi familia, mis padres y hermano, por vuestro apoyo incondicional pase lo que pase y haga lo que haga.

Y a Moisés, por tu gran paciencia, comprensión y apoyo incondicionales, por estar ahí siempre, muchísimas gracias.

Mil gracias a todos.

Este trabajo ha sido realizado gracias a la Beca asociada al proyecto 06046-00 de la Conserjería de Sanidad de la Junta de comunidades de Castilla La Mancha, a la Beca de Perfeccionamiento y Movilidad de Jóvenes Investigadores en el campo de la Salud (MOV-2008_JI/2) del FISCAM y al proyecto de investigación en salud (PI081662) del Fondo de Investigaciones Sanitarias del Instituto de Salud Carlos III.

DEDICATORIA

Abreviaturas

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

ALPL: *Alkaline phosphatase*

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

BAM22: *Beta-adaptin 1*

BCR: *Breakpoint cluster región*

CCND1: Ciclina D1

CDH1: E-cadherina

CDKN2A: Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 2A

CDKN2B: Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 2C

CDKN2C: Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 2C

CEA: Antígeno carcinoembrionario (*carcinoembryonic antigen*)

CGH: Hibridación genómica comparada (*Comparative Genome Hybridization*)

CKS2: *Cyclin-dependet kinases regulatory subunit 2*

CREBBP: *CREB binding protein*

CTGF: Factor de crecimiento de tejido conectivo

DAL1: *Differentially expressed in adenocarcinoma of the lung protein 1*

EMA: Antígeno epitelial de membrana (*epitelial membrane antigen*)

EPB41: *Erythrocyte membrane protein band 4.1*

EST: *Expressed Sequence Tags*

FDR: *False Discovery Rate*

FISH: Hibridación *in situ* fluorescente (*Fluorescent In Situ Hybridization*)

GADD45A: *Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha*

GADPH: Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa

GDE: Genes Diferencialmente Expresados

HES7: *Hairy and enhancer of split 7*

HIST1H1C: *Histone cluster 1, H1c*

IRM: Imágenes de resonancia magnética

KREMEN1: *Kringle containing transmembrane protein 1*

LARGE: *Like-glycosyltransferase*

LEPR: *Leptin receptor*

LMO4: *LIM domain only 4*

LTBP2: *Latent transforming growth factor beta binding protein 2*

MEG3: *Maternally expressed 3*

MIB-1: Índice mitótico

MN1: Meningioma 1

MS-PCR: PCR específica de metilación (*Methylation-Specific PCR*)

NDRG2: *N-myc downstream regulated family member 2*

NF2: Neurofibromatosis tipo II

OMS: Organización Mundial de la Salud

p14^{ARF}: Proteína tumoral p53

qRT-PCR: PCR cuantitativa a tiempo real

RISC: *RNA-induced silencing complex*

RPS6KB1: *Ribosomal protein S6 kinase*

RRP22: *RAS-like, family 10, member*

SERPINF1: *Serpin peptidase inhibitor F1*

SFRP1: *Secreted frizzled-related protein 1*

SFRP4: *Secreted frizzled-related protein 4*

SLR: Supervivencia libre de recidiva

SMARCB1: *SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1*

SNC: Sistema Nervioso Central

TAp73: Proteína tumoral p73

TBP: *TATA box binding protein*

TGFBR2: Receptor 2 del TGF- β

TGFBR3: Receptor 3 del TGF- β

TIMP3: *Tissue inhibitor of metalloproteinase 3*

TMEM30B: Proteína transmembrana 30B

TSLC1: *Tumor Suppressor in Lung Cancer-1*

UCHL1: *Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1*

Índice

ÍNDICE

RESUMEN.....	9
INTRODUCCION.....	15
1. Incidencia	15
2. Tratamiento y complicaciones clínicas.....	15
3. Clasificación e histopatología.....	16
4. Alteraciones moleculares implicadas en meningiomas	19
4.1. Pérdida de 22q.....	20
4.1.1. Gen de la Neurofibromatosis tipo II, <i>NF2</i>	20
4.1.2. Otros genes relacionados con <i>NF2</i>	22
4.1.3. Genes supresores de tumores localizados en 22q	22
4.2. Pérdida de 1p	24
4.3. Pérdida de 14q	24
4.4. Alteraciones en 9p: genes <i>CDKN2A</i> , <i>p14^{ARF}</i> , y <i>CDKN2B</i>	25
4.5. Amplificación de la región 17q.....	26
5. Estudios de expresión génica mediante microarrays en meningiomas.....	26
6. MicroRNAs.....	28
6.1. Definición	28
6.2. microRNAs y cáncer	30
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	31
MATERIALES Y MÉTODOS	35
1. Procedencia de las muestras.....	37
2. Pacientes y muestras.....	37
3. Metodología	38
3.1. Extracción de ácidos nucleicos.....	38
3.1.1. Extracción de ADN	38
3.1.2. Extracción ARN	38

3.1.3. Medida de calidad y concentración de ácidos nucleicos.....	38
3.2. Análisis de microarrays de expresión génica	39
3.2.1. Muestras utilizadas.....	39
3.2.2. Plataforma de análisis.....	39
3.2.3. Marcaje del ARN con fluorocromos.....	40
3.2.4. Hibridación y lavados.....	40
3.2.5. Escaneo y Lectura de fluorescencia.....	40
3.2.6. Normalización de los datos.....	41
3.3. Análisis de microarrays de microRNAs.....	41
3.3.1. Muestras utilizadas.....	41
3.3.2. Plataforma de análisis.....	41
3.3.3. Marcaje del ARN con fluorocromos.....	42
3.3.4. Hibridación y lavados.....	42
3.3.5. Escaneo y lectura de fluorescencia.....	42
3.3.6. Normalización de los datos.....	42
3.4. Análisis bioinformático de los datos de microarrays	43
3.4.1. Procesamiento y análisis de datos.....	43
3.4.2. Agrupaciones jerárquicas	43
3.4.3. Análisis funcionales.....	43
3.4.4. Bases de datos	43
3.5. Análisis de PCR Cuantitativa a Tiempo Real (qRT-PCR).....	44
3.5.1. Muestras utilizadas.....	44
3.5.2. PCR cuantitativa a tiempo real	44
3.6. Análisis de metilación del ADN	46
3.6.1. Muestras utilizadas.....	46
3.6.2. Tratamiento del ADN con bisulfito sódico.....	47
3.6.3. PCR específica de metilación (<i>MS-PCR</i>).....	47

3.6.4. Secuenciación del ADN tratado con bisulfito	48
3.7. Matrices de Tejido y Técnicas de Inmunohistoquímica	50
3.7.1. Muestras utilizadas.....	52
3.7.2. Tinción inmunohistoquímica	52
3.8. Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (<i>FISH</i>).....	53
3.9. Análisis estadísticos.....	54
4. Muestras de otros estudios.....	54
RESULTADOS	57
1. Descripción de la serie	59
2. Perfil de expresión génica y de microRNAs en el desarrollo de meningiomas	59
2.1. Firma molecular de meningiomas.....	59
2.2. Perfil de expresión de microRNAs en meningiomas	62
2.3. Correlación entre la expresión génica y la expresión de microRNAs.....	63
2.4. Validación de genes y microRNAs candidatos asociados al desarrollo de los meningiomas	65
2.4.1. Validación de la expresión de microRNAs mediante qRT-PCR	65
2.4.2. Análisis de la expresión proteica de marcadores candidatos mediante estudios de inmunohistoquímica	65
3. Perfil de expresión génica y de microRNAs asociado a recidiva de meningioma	67
3.1. Perfil de expresión génica de recidivas	67
3.2. Rutas moleculares asociadas a la recidiva del tumor	70
3.3. Perfil de microRNAs asociado a la recidiva tumoral	70
3.4. Análisis de alteraciones cromosómicas en meningiomas recurrentes	72
3.4.1. Localización cromosómica de genes asociados a recidiva	72
3.4.2. Análisis de la pérdida de 1p mediante FISH	75
4. Análisis del perfil de expresión común entre progresión y recidiva de meningioma	76
4.1. Perfil de expresión común asociado a progresión y recidiva.....	76
5. Validación de la expresión de los genes asociados a recidiva y progresión	80

5.1. Validación de la expresión génica y de microRNAs mediante análisis de qRT-PCR	81
5.2. Análisis de la expresión proteica mediante técnicas inmunohistoquímicas.....	82
5.3. Análisis de la supervivencia libre de recidiva basada en la expresión de <i>CKS2</i>	83
5.4. Análisis de metilación de <i>UCHL1</i> y <i>SFRP1</i>	84
DISCUSIÓN	89
Perfiles de expresión génica y de microRNAs en meningiomas	91
Perfiles de expresión en recidiva de meningioma	94
Perfil de expresión de meningiomas agresivos.....	98
CONCLUSIONES	101
BIBLIOGRAFÍA.....	105
ANEXO	121
I. ARTÍCULO 1: Differential expression profiling analyses identifies downregulation of 1p, 6q and 14q genes and overexpression of 6p histone cluster 1 genes as markers of recurrence in meningiomas	123
II. ARTÍCULO 2: Genetic alterations associated with progression and recurrence in meningiomas.....	139

Resumen

Los meningiomas son tumores sólidos del Sistema Nervioso Central que se originan a partir de las células aracnoidales que recubren cerebro y médula espinal. Constituyen aproximadamente, el 33% de los tumores intracraneales primarios. Muchos meningiomas pasan desapercibidos a lo largo de la vida y son encontrados accidentalmente en un 1,4% de las autopsias.

Mientras que la gran mayoría de los meningiomas son benignos y de crecimiento lento (grado I de la Organización Mundial de la Salud, OMS), los meningiomas atípicos y anaplásicos, de grados II y III, respectivamente, son clínicamente más agresivos. Por tratarse de una tumoración habitualmente benigna y con crecimiento generalmente local, en una alta proporción de casos la resección quirúrgica es capaz de curar al paciente.

Sin embargo, a pesar de que la mayoría de meningiomas son benignos, existen casos que muestran una mayor agresividad clínica e histológica, presentándose a veces con una elevada tasa de recurrencia, incluso después de una extirpación quirúrgica completa.

El estudio de los mecanismos moleculares subyacentes en estos tumores es fundamental para mejorar la exactitud del diagnóstico y el pronóstico individual de pacientes con meningiomas. El objetivo del presente estudio es caracterizar los perfiles de expresión génica y de microRNAs asociados con el desarrollo y recidiva de los meningiomas, así como determinar si existen características genéticas comunes entre los meningiomas recurrentes y los de alto grado (grados II y III de la OMS), considerados clínicamente más agresivos.

En este estudio se ha identificado un perfil de expresión génica asociado al desarrollo de meningiomas, compuesto en su mayor parte por genes reprimidos, lo que está de acuerdo con la mayor frecuencia de pérdida de material genético descrita en estos tumores. Este perfil está formado por genes que podrían estar implicados en el desarrollo de meningiomas, como el gen de la E-cadherina (*CDH1*), que codifica para una molécula de adhesión que se asocia con la merlina en los contactos célula-célula. La sobreexpresión de *CDH1* promueve la expresión de genes asociados a ciclo celular, como la ciclina D1 (*CCND1*), lo que concuerda con la alta expresión de este gen

encontrada en este estudio. Igualmente, se han identificado varios genes asociados a rutas alteradas en estos tumores como *HES7*, asociado a la ruta NOTCH, o varios miembros de la ruta de señalización de NF- κ B. Además, se ha identificado un perfil de microRNAs alterado en los meningiomas compuesto por microRNAs que están sobreexpresados en su mayoría respecto a la expresión en tejido meningotelial no tumoral. Esto sugiere que las alteraciones en los microRNAs podrían suponer un mecanismo alternativo de inactivación génica en los meningiomas.

El estudio del perfil de expresión génica permitió mostrar, en línea con los resultados de otros autores, que los tumores recurrentes presentaban las mismas alteraciones genéticas en la recidiva y en el momento del diagnóstico, sugiriendo que la capacidad para recidivar de estos tumores ya está presente en la primera aparición del tumor.

Por otro lado, se ha identificado un perfil de expresión génica, y de microRNAs que permite distinguir entre meningiomas no recurrentes y recidivas. La mayoría de genes diferencialmente expresados entre meningiomas originales y recurrentes estaban localizados en 1p, 6q, y 14q, encontrándose reprimidos en recidivas. En estas localizaciones se han propuesto nuevos genes candidatos que podrían estar implicados en la recidiva de meningioma, tales como *LMO4*, *TMEM30B* o *CTGF*. Además, se ha identificado por primera vez la sobreexpresión de genes de la familia de las histonas 1 (6p) en recidiva de meningiomas. Por otra parte, el análisis de la pérdida de 1p indica que esta alteración se asocia de manera significativa con un mayor riesgo de recidiva.

Como se ha mencionado anteriormente, a pesar de que la mayoría de meningiomas son tumores benignos, existen casos que presentan un curso clínico más agresivo, incluso con un diagnóstico benigno o una extirpación quirúrgica completa. Por ello, en este trabajo se analizó si los meningiomas recurrentes y de alto grado presentaban características genéticas comunes que pudieran contribuir a una mayor agresividad clínica de los meningiomas. Esto nos permitió identificar un perfil de expresión génica compuesto por 49 genes asociados a agresividad. Esta firma clasificó los tumores en dos grupos moleculares que mostraron un comportamiento clínico y

patológico diferente. Entre ellos cabe destacar el gen *CKS2*, implicado en el control del ciclo celular y cuya alta expresión se asocia a un menor tiempo libre de recidiva.

Debido a la represión génica identificada a través de los análisis de expresión génica en meningiomas recurrentes y de alto grado, se ha analizado la hipermetilación del promotor en dos genes candidatos, *UCHL1* y *SFRP1*, sugiriendo que este mecanismo epigenético, así como la pérdida de regiones cromosómicas específicas, podrían desempeñar un papel importante en la progresión y recidiva de meningioma.

Introducción

1. Incidencia

Los tumores primarios del Sistema Nervioso Central (SNC) representan el 2% de todas las neoplasias, de los cuales, los meningiomas son los tumores más frecuentes y constituyen aproximadamente, el 34,7% de los tumores intracraneales primarios. La incidencia anual es de 6 por 100.000 personas, siendo los causantes del 6% de fallecimientos por tumor cerebral (1, 2). Normalmente afectan a los adultos, con un pico entre la sexta y séptima décadas de la vida. Es más frecuente entre mujeres, con una razón 2:1 (2).

Los meningiomas son tumores originados en las células de la capa externa de la membrana aracnoidea (meningoblastos). Habitualmente, constituyen masas bien delimitadas, lobuladas y adheridas a la duramadre, aunque pueden presentarse en otras localizaciones alejadas de la misma como la intraventricular.

2. Tratamiento y complicaciones clínicas

El tratamiento de los meningiomas es quirúrgico. Por tratarse de una tumoración habitualmente benigna y con crecimiento generalmente local, en una alta proporción de casos la resección quirúrgica es capaz de curar al paciente. Hay que destacar que muchos meningiomas son lesiones de tamaño pequeño y asintomáticas, que se diagnostican como un hallazgo incidental en autopsias o en pruebas de imagen como resonancias magnéticas (1-3).

Simpson clasificó la cirugía de los meningiomas en cinco grados atendiendo al grado de resección tumoral, implantación en la duramadre, e infiltración del hueso normal adyacente, Tabla 1, (4):

Grado I	Resección macroscópicamente completa del tumor, implantación en duramadre y hueso normal adyacente
Grado II	Resección macroscópicamente completa de la tumoración y coagulación de la base de la implantación dural
Grado III	Resección macroscópicamente completa del tumor intradural sin resección o coagulación de la base de implantación
Grado IV	Resección subtotal del tumor
Grado V	Descompresión o biopsia del tumor

Tabla 1. Resección tumoral en meningiomas (grados de Simpson).

La principal complicación clínica de los meningiomas es la recidiva tumoral que se produce en un 10-15% y 25-37% de los pacientes sometidos a cirugía tras períodos de 5 y 10 años de seguimiento, respectivamente (5, 6). Los factores predictivos de recidiva tumoral más importantes en meningiomas son la extensión de la extirpación del tumor y el grado histológico (7-9). Sólo una pequeña proporción de todos los meningiomas histológicamente benignos de grado I de la OMS recidivan, siendo la mayoría de las recidivas de tumores atípicos y anaplásicos, además, suelen ocurrir en los primeros años después de la extirpación quirúrgica completa (5, 6). A pesar de esto, en términos absolutos, la mayoría de recidivas se corresponden con meningiomas benignos, incluso después de una extirpación completa (5).

3. Clasificación e histopatología

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica los meningiomas en grado I, grado II y grado III (9). Aproximadamente, el 90% de los meningiomas son tumores benignos de grado I, que presentan un crecimiento lento. Los meningiomas atípicos o de grado II constituyen del 6% al 8% de los casos, son tumores con mayor actividad mitótica (cuatro o más mitosis por 10 campos de gran aumento) o cumplen al menos tres de los siguientes criterios: celularidad incrementada, alta proporción núcleo/citoplasma, nucléolos prominentes, patrón

de crecimiento en forma de “sábana” y/o necrosis. Aproximadamente, el 2-3% de todos los meningiomas muestran características de malignidad, incluyendo una alta actividad mitótica (20 o más mitosis por 10 campos de gran aumento) y/o una histología similar a sarcoma, carcinoma o melanoma (9).

En general, los meningiomas presentan una amplia gama de patrones histológicos, y normalmente aparecen mezclados en un mismo tumor. La actual clasificación de la OMS cataloga 15 variantes o subtipos histológicos, correspondientes a grados I, II y III (Figura 1), (Tabla 2). Dentro de estos subtipos los más frecuentes son los meningiomas meningoteliales, fibrosos y transicionales.

Meningiomas con bajo riesgo de recidiva y crecimiento lento	
Grado I	Meningioma meningotelial
	Meningioma fibroso (fibroblástico)
	Meningioma transicional (mixto)
	Meningioma psamomatoso
	Meningioma angiomatoso
	Meningioma microcístico
	Meningioma secretor
	Meningioma rico en linfoplasmocitos
	Meningioma metaplásico
Meningiomas con alto riesgo de recidiva y crecimiento agresivo	
Grado II	Meningioma cordoide
	Meningioma de células claras
	Meningioma atípico
Grado III	Meningioma papilar
	Meningioma rabdoide
	Meningioma anaplásico (maligno)

Tabla 2. Meningiomas agrupados por probabilidad de recidiva y grado (9).

Los pacientes con meningiomas benignos o de grado I de la OMS, muestran un mejor pronóstico que aquellos pacientes con meningiomas de alto grado, puesto que las resecciones completas son más comunes y la capacidad proliferativa es menor (10).

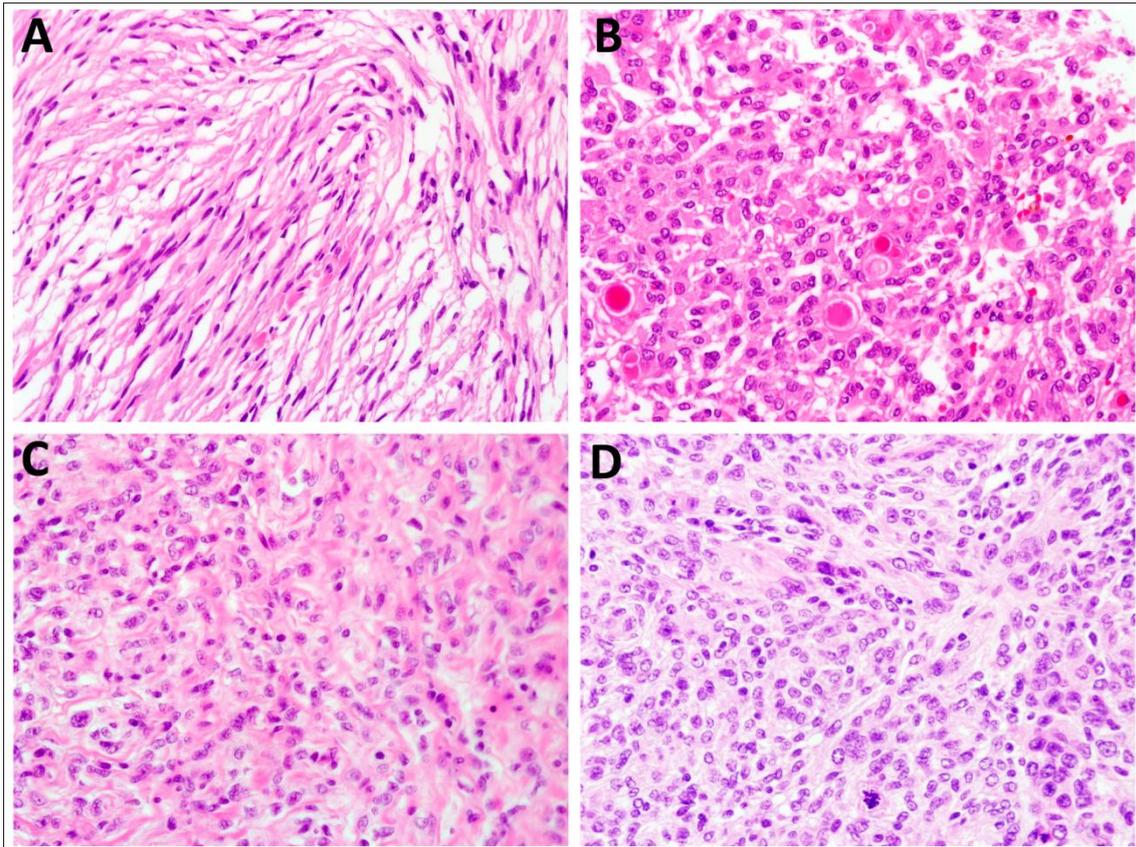


Figura 1. Imágenes histopatológicas de A: meningioma fibroso de grado I; **B:** meningioma secretor de grado I; **C:** meningioma atípico de grado II, y **D:** un meningioma anaplásico de grado III.

La gran mayoría de meningiomas son positivos con la tinción para el antígeno epitelial de membrana EMA (*epithelial membrane antigen*), aunque la tinción con EMA es menos consistente en meningiomas atípicos y anaplásicos (9, 11).

Todos los meningiomas son positivos para la vimentina. De forma característica, los meningiomas secretores muestran tinción positiva para el antígeno carcinoembrionario CEA (*carcinoembryonic antigen*) en las luces pseudoglandulares y en las células que los rodean (9, 11, 12).

Otros marcadores inmunohistoquímicos de gran utilidad en ciertos casos incluyen Ki-67/MIB-1, el cual ayuda a valorar el potencial de proliferación, y los receptores de progesterona, cuya expresión se asocia de forma inversa con el grado tumoral (9, 11-14).

4. Alteraciones moleculares implicadas en meningiomas

Los meningiomas se encuentran entre los primeros tumores sólidos en los que se describieron alteraciones citogenéticas, la más frecuente es la delección y/o monosomía del cromosoma 22, y está considerada como un factor temprano en la patogénesis de los meningiomas (9, 15). Los análisis de las alteraciones cromosómicas asociadas al grado histológico utilizando distintas técnicas como la hibridación *in situ* fluorescente (FISH) y la hibridación genómica comparada (CGH) han mostrado la adquisición de cambios genéticos y citogenéticos adicionales, según aumenta el grado tumoral. Entre otros cambios citogenéticos asociados a meningioma, las delecciones de 1p, 6q, 10q, 14q y 18q, son las alteraciones citogenéticas más frecuentes en meningiomas atípicos, sugiriendo la existencia de genes asociados a progresión en estos loci. Estas alteraciones, con pérdidas más frecuentes de los cromosomas mencionados, además de en 9p, se dan en meningiomas anaplásicos. Las ganancias cromosómicas observadas son menos frecuentes, y en meningiomas de alto grado incluyen los cromosomas 1q y 17q (Figura 2) (16-20). Por otra parte, la delección de 1p y la monosomía del cromosoma 14 han sido asociadas con la recidiva tumoral (5, 21).

El hecho de que los meningiomas de alto grado (II y III) presenten una mayor frecuencia de alteraciones cromosómicas, sugiere que la formación de tumores más agresivos podría ser consecuencia de la adquisición progresiva de estas alteraciones (22-25). Sin embargo, no está muy claro si estos tumores proceden de precursores de menor grado o si surgen como tumores agresivos que no expresan completamente su agresividad de forma histopatológica, pero sí poseen un potencial genético más agresivo (26).

Células aracnoideas o precursoras

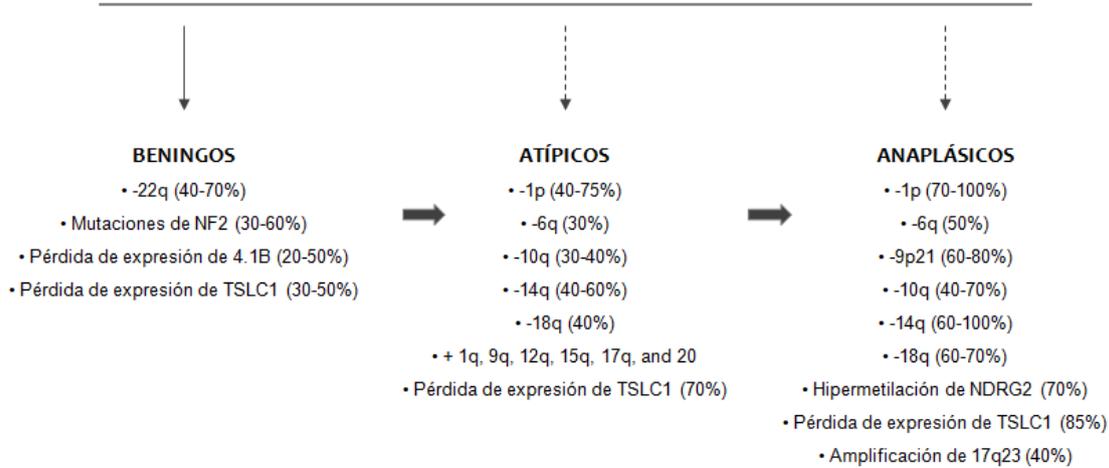


Figura 2. Modelo de acumulación de alteraciones cromosómicas en meningiomas.

4.1. Pérdida de 22q

4.1.1. Gen de la Neurofibromatosis tipo II, *NF2*

La mayoría de meningiomas familiares están asociados con el síndrome de Neurofibromatosis tipo II (*NF2*), en el que los meningiomas son los tumores más comunes después del schwannoma vestibular (27). Este síndrome está causado por mutaciones en el gen de la neurofibromatosis *NF2* (22q).

Aproximadamente la mitad de los meningiomas esporádicos muestran alteraciones en el gen de la neurofibromatosis 2 (*NF2*), el cual se considera el principal candidato en la génesis de estos tumores (11, 28, 29). Se han encontrado pérdidas alélicas de la región cromosómica 22q12.2, entre el 40-70% de los meningiomas esporádicos, y en la gran mayoría de meningiomas asociados a *NF2* (30). La mayoría de mutaciones que afectan al gen *NF2* son pequeñas inserciones, deleciones o mutaciones sin sentido que afectan a numerosos sitios de *splicing*, siendo la frecuencia de mutaciones en *NF2* más o menos igual entre los distintos grados de malignidad. Esta similitud entre los distintos grados de meningiomas sugiere que estas alteraciones son responsables del inicio del tumor, y no de su progresión (28).

El silenciamiento transcripcional por hipermetilación de islas CpG en la región promotora de los genes constituye un mecanismo alternativo de inactivación génica. Kino y colaboradores demostraron la existencia de una región de 70 pb del promotor de *NF2* (de -591 a -522 pb desde el lugar de comienzo de la transcripción) esencial para la expresión del gen (31). Se han identificado tres sitios CpG dentro de esta región (en posiciones -591, -586 y -581) cuya metilación está implicada en el silenciamiento de *NF2* en schwannomas (31).

En este sentido, se ha sugerido que la metilación del promotor del gen *NF2* podría estar implicada en el desarrollo de una parte significativa de meningiomas esporádicos, sobretodo de grado I (17). Sin embargo, existen dos estudios que han llevado a cabo análisis de metilación, en los que se concluye que es poco probable que la metilación del promotor de *NF2* juegue un papel importante en el silenciamiento de este gen en meningiomas (32, 33).

El producto del gen *NF2* se denomina merlina o schwanomina, se expresa durante el desarrollo embrionario y en adultos su expresión es marcada en células de Schwann, células de las meninges, el cristalino y el nervio óptico. La merlina es miembro de la familia de proteínas de membrana 4.1, la cual incluye, además, las proteínas ezrina, radixina y moesina. Estas proteínas contribuyen a la interacción entre glicoproteínas de la superficie celular y el citoesqueleto de actina, y transducen señales desde receptores de membrana hasta componentes intracelulares (34). Además, se ha propuesto que la merlina es fundamental para detener la proliferación celular dependiente del contacto célula-célula e inducir la apoptosis a través de la ruta Hippo en *Drosophila* (34). Todos los componentes de esta ruta (incluidos genes y mecanismos de transducción) se conservan en vertebrados, sugiriendo que la función de la merlina en la ruta Hippo podría tener importantes implicaciones en el estudio y tratamiento de varios tipos de cáncer (35).

Por otra parte, otro mecanismo de inactivación génica del gen *NF2* en meningiomas, podría ser debido al aumento en la proteólisis de la merlina mediada por una proteasa, la calpaína. Esto fue observado por Kimura y colaboradores, los cuales demostraron una activación incrementada en el sistema de la calpaína (36).

4.1.2. Otros genes relacionados con NF2

Además del gen *NF2*, existe otro gen que codifica para un miembro de la familia de proteínas 4.1, el gen *DAL1* (*Differentially expressed in adenocarcinoma of the lung protein 1*), (37). Este gen codifica para la proteína 4.1B, localizada en la región cromosómica 18p11.3 (18), y se encuentra silenciado en la mayoría de los meningiomas esporádicos.

La frecuencia de mutaciones encontrada en este gen es muy baja, por lo que el silenciamiento de *DAL1* se debe probablemente a otros mecanismos como podrían ser los cambios epigenéticos (38). La ausencia de expresión de la merlina y *DAL1*, en la mayoría de meningiomas esporádicos sugiere que las alteraciones asociadas a membrana son acontecimientos importantes en el desarrollo y/o progresión de los meningiomas.

Por otro lado, se ha observado la pérdida de expresión del gen *TSLC1* (*Tumor Suppressor in Lung Cancer-1*, 11q) entre el 30% y el 50% de meningiomas benignos; y en el 70% y 85% de meningiomas atípicos y anaplásicos, respectivamente (39). Además, se ha descrito una posible interacción de este gen supresor de tumores en cáncer de pulmón con *DAL1*, en zonas de unión célula-célula, donde este complejo de unión depende de la integridad del citoesqueleto de actina (40). Asimismo, se ha puesto de manifiesto la posibilidad de que *TSLC1* sea un indicador de supervivencia en pacientes con meningiomas atípicos, ya que la pérdida de expresión de este gen se correlaciona con una disminución en la supervivencia del paciente (39).

4.1.3. Genes supresores de tumores localizados en 22q

La asociación de mutaciones en *NF2* junto con la pérdida alélica en el cromosoma 22, sugieren que el gen *NF2* es el principal gen supresor de tumores localizado en dicho cromosoma (15, 29, 33, 41-44).

No obstante, se han detectado pérdidas y translocaciones de material genético en el cromosoma 22 en regiones distintas a la del gen *NF2*, sugiriendo la existencia de otros genes en este cromosoma implicados en el desarrollo de meningiomas (Figura 3).

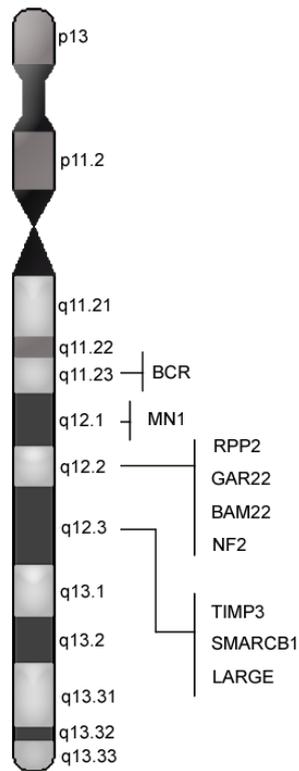


Figura 3. Cromosoma 22 con genes supresores de tumores candidatos asociados a meningioma.

Varios estudios consideran *BAM22* (*Beta-adaptin 1*) como un gen importante en el desarrollo de meningiomas. Este gen pertenece a la familia de las β -adaptinas humanas, esenciales para el transporte intracelular de complejos receptor-ligando (45, 46).

El gen *BCR* (*Breakpoint cluster región*) es un candidato a supresor de tumores interesante, ya que realiza funciones similares al gen *NF2*, y su expresión está reducida en meningiomas con pérdida de heterocigosidad de 22q (47).

El gen *TIMP3* (*Tissue inhibitor of metalloproteinase 3*) se ha asociado con la progresión de meningiomas debido a que el 67% de meningiomas anaplásicos mostraron una hipermetilación del promotor de *TIMP3*, mientras que en meningiomas atípicos y benignos solo se daba en un 22% y 17% de casos, respectivamente (48).

Asimismo, se han propuesto otros genes localizados en el cromosoma 22q como posibles genes supresores de tumores: *MN1*, *SMARCB1*, *LARGE* y *RRP22*. El gen *MN1* (*meningioma 1*) está interrumpido por una translocación t(4; 22) en un caso de un meningioma esporádico y ha sido relacionado con la patogénesis de este tipo tumoral (49). Se han descrito mutaciones en el gen *SMARCB1* (*SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1*) que se han asociado a tumores rabdoideos malignos (18, 50). El gen *LARGE* (*like-glycosyltransferase, 22q12.3*) podría estar implicado en reordenamientos genómicos asociados a tumores (18). Por último, el gen *RRP22* (*RAS-like, family 10, member A*) está implicado en la regulación de procesos de transporte nucleolar (51).

4.2. Pérdida de 1p

La pérdida de 1p representa la alteración genética más frecuente después de las alteraciones en el cromosoma 22 (*NF2*/otros), esta alteración parece estar implicada en la génesis de meningiomas agresivos, y se da, predominantemente, en meningiomas atípicos (40-76%) y anaplásicos (70-100%), a diferencia de los meningiomas benignos (13-26%) (5, 52, 53).

Mediante análisis de pérdida de heterocigosidad se ha demostrado que las regiones principalmente afectadas son 1p36 y 1p32-34, aunque también se han detectado alteraciones menos frecuentes en 1p22 y 1p21.1-p13 (53). Por lo tanto, estas regiones pueden albergar uno o más genes supresores de tumores importantes en la progresión de meningiomas. Se han propuesto algunos genes candidatos tales como: *ALPL*, *TAp73*, *EPB41*, *GADD45A* y *CDKN2C*. (54-57).

4.3. Pérdida de 14q

Otra anomalía citogenética frecuente en meningiomas es la pérdida de 14q, cuya frecuencia aumenta con el grado histológico: una tercera parte de los meningiomas benignos muestran pérdida de 14q, mientras que en meningiomas atípicos y anaplásicos se da en el 40-57% y 55-100%, respectivamente, (15, 19, 58-60). Varios estudios han descrito diferentes regiones implicadas en meningiomas localizadas desde 14q21 a 14q32 (18, 19). Sin embargo, hasta la fecha, las dianas de

esta pérdida cromosómica no se han identificado y no se ha confirmado ningún gen supresor de tumores en meningiomas localizado en 14q. No obstante, se han evaluado genes candidatos en 14q, como *NDRG2* y *MEG3*.

El gen *NDRG2* (*N-myc downstream regulated family member 2*) es miembro de la familia de N-myc y codifica una proteína citoplasmática que participa en el crecimiento celular, la diferenciación, el estrés y las respuestas hormonales (61). La expresión de *NDRG2* se ha visto alterada en otros tipos tumorales como los gliomas (62). En meningiomas, Lusi y colaboradores han identificado este gen como posible supresor de tumores, encontrándose inactivado en meningiomas de alto grado (63). Además, se ha mostrado que la pérdida de expresión de *NDRG2* estaba asociada, significativamente, con la hipermetilación del promotor del mismo (63, 64).

Recientemente, se ha descrito que el gen *MEG3* (*maternally expressed 3*), el cual codifica para un ARN no codificante, podría ser un supresor de tumores localizado en 14q32 implicado en la progresión de los meningiomas, ya que se ha observado que la pérdida de expresión del ARN del gen *MEG3* es más frecuente en meningiomas de alto grado, y además, la expresión de este gen en líneas celulares de meningiomas suprime el crecimiento tumoral. Sin embargo, los mecanismos aún se desconocen (65).

4.4. Alteraciones en 9p: genes *CDKN2A*, *p14^{ARF}*, y *CDKN2B*

Las pérdidas en el cromosoma 9p, particularmente en la región 9p21, se han encontrado más frecuentemente en meningiomas anaplásicos, siendo raras en meningiomas atípicos y benignos (19, 54). Dicha región contiene los supresores de tumores *CDKN2A* (*p16^{INK4a}*), *p14^{ARF}*, y *CDKN2B* (*p15^{INK4b}*), cuya participación en el control del ciclo celular, y su implicación en una gran variedad de tumores humanos ha sido ampliamente estudiada (11).

El análisis de las alteraciones de estos supresores de tumores en meningiomas puso de manifiesto la presencia de deleciones homocigotas y mutaciones, así como ausencia de expresión de uno o varios de estos genes en meningiomas anaplásicos. Por tanto, la alteración en puntos de control del ciclo celular es importante en

meningiomas de alto grado, contribuyendo al rápido crecimiento y al comportamiento maligno de estos tumores (54, 66).

4.5. Amplificación de la región 17q

La amplificación de la región 17q21 en meningiomas se ha puesto de manifiesto mediante estudios de hibridación genómica comparada (HGC). Esta amplificación se ha asociado con el mecanismo de progresión de tumores atípicos a anaplásicos, ya que se encontró un alto nivel de amplificación en 17q en meningiomas anaplásicos (48-60%) y en pocos (0-4,8%) o ninguno de los tumores atípicos y benignos, respectivamente (19, 67).

El gen de la quinasa S6 (*RPS6KB1*) se analizó como diana de la amplificación en 17q en meningiomas anaplásicos, debido a su localización en 17q23 (67) y a una expresión incrementada del ARNm de S6K en estos tumores en comparación con meningiomas benignos (68). Experimentos en líneas celulares de meningiomas revelaron que no había efectos de la sobreexpresión de S6K en el crecimiento celular, motilidad o adhesión *in vitro*, aunque una sobreexpresión de S6K sí que conlleva un incremento en el tamaño del tumor *in vivo* (68). Aunque no se han descrito amplificaciones del gen *S6K* en otros estudios (69), Surace y colaboradores sugieren que S6K podría ser importante en la progresión de los meningiomas (68).

5. Estudios de expresión génica mediante microarrays en meningiomas

El conocimiento de la secuencia completa del genoma humano y el desarrollo de técnicas de análisis a gran escala han permitido analizar miles de genes. Desde mediados de los años noventa existe una potente técnica de análisis genómico de expresión como son los microarrays de ácidos nucleicos, la cual ha supuesto un impulso tecnológico determinante en la investigación del cáncer, permitiendo un conocimiento más amplio de la biología tumoral y por tanto favoreciendo la identificación de marcadores candidatos para el diagnóstico, pronóstico y predicción de respuesta al tratamiento de los pacientes.

La mayoría de los estudios de microarrays en meningiomas se han centrado en encontrar perfiles de expresión génica diferencial entre distintos grupos de meningiomas, identificando una serie de genes, rutas y alteraciones cromosómicas asociadas al desarrollo de los meningiomas, a la progresión y a la recidiva tumoral (70-77).

De entre estos estudios cabe destacar el trabajo de Lusi y colaboradores (2005), en el que observaron que el 40% de genes reprimidos en meningiomas de alto grado se localizaban en 1p y 14q, proponiendo el gen *NDRG2*, localizado en 14q, como marcador tumoral relevante para predecir el comportamiento agresivo de ciertos meningiomas (63, 76).

Carvalho y colaboradores (2007) identificaron un perfil de expresión génica que permitió clasificar los meningiomas en dos grandes grupos moleculares: uno de baja proliferación que incluía meningiomas benignos y otro de alta proliferación compuesto por tumores anaplásicos. Los meningiomas atípicos se distribuían en ambos grupos, sugiriendo que el perfil de expresión génica identificado, permite diferenciar meningiomas atípicos de crecimiento lento, de aquellos con un crecimiento más agresivo (75).

Por otra parte, Keller y colaboradores se centraron en la identificación de rutas alteradas entre meningiomas de bajo y alto grado. Entre las rutas moleculares alteradas en meningiomas destacaron rutas reprimidas como las interacciones entre citoquinas y sus ligandos, cascadas de complemento y coagulación, y citotoxicidad mediada por células *natural killer*, así como rutas sobreexpresadas: el metabolismo de fructosa y manosa, y el metabolismo de nucleótidos.

En uno de los últimos estudios de perfiles de expresión génica publicado en 2011, Menghi y colaboradores identificaron un índice de expresión entre los genes *CKS2* (*cyclin-dependet kinases regulatory subunit 2*) y *LEPR* (*leptin receptor*) que podría ser relevante para definir el riesgo de progresión en pacientes con meningioma (72).

6. MicroRNAs

Actualmente se están investigando otros mecanismos epigenéticos de regulación génica, como son los microRNAs, debido a su importancia clínica y biológica en cáncer.

6.1. Definición

Los microRNAs son moléculas de ARN de cadena sencilla, endógenos y de pequeño tamaño, de alrededor de 22 nucleótidos. Estos ARNs no codificantes son moléculas con funciones estructurales, enzimáticas y reguladoras, que proceden de precursores de doble cadena en forma de horquilla (78). Inhiben la expresión del ARNm diana mediante la rotura del ARNm o bien mediante la represión de la traducción (78). La elección de un mecanismo u otro viene determinada por la identidad de la diana y no por el tipo de microRNA, es decir, si el ARNm tiene suficiente complementariedad con el microRNA se llevará a cabo la degradación, si no, se reprimirá la traducción mediante un mecanismo desconocido conservando el ARNm. Además, tras la degradación del ARNm, el microRNA queda intacto, pudiendo guiar el reconocimiento y degradación de mensajeros adicionales (79).

Las secuencias precursoras de estas moléculas se incluyen en el genoma, en áreas no relacionadas con genes conocidos, y sufren un procesamiento hasta llegar a su forma madura y activa. Inicialmente se transcriben en transcritos primarios, o pri-microRNAs por la RNA polimerasa II, posteriormente, este pri-microRNA libera en el núcleo estructuras en horquilla de 70 nucleótidos, denominados microRNAs precursores, o pre-microRNAs. Estos son seleccionados y exportados al citoplasma donde el complejo enzimático RISC (*RNA-induced silencing complex*) dará lugar a los fragmentos de aproximadamente 22 pares de bases que conforman los microRNAs ya maduros (Figura 4), (80).

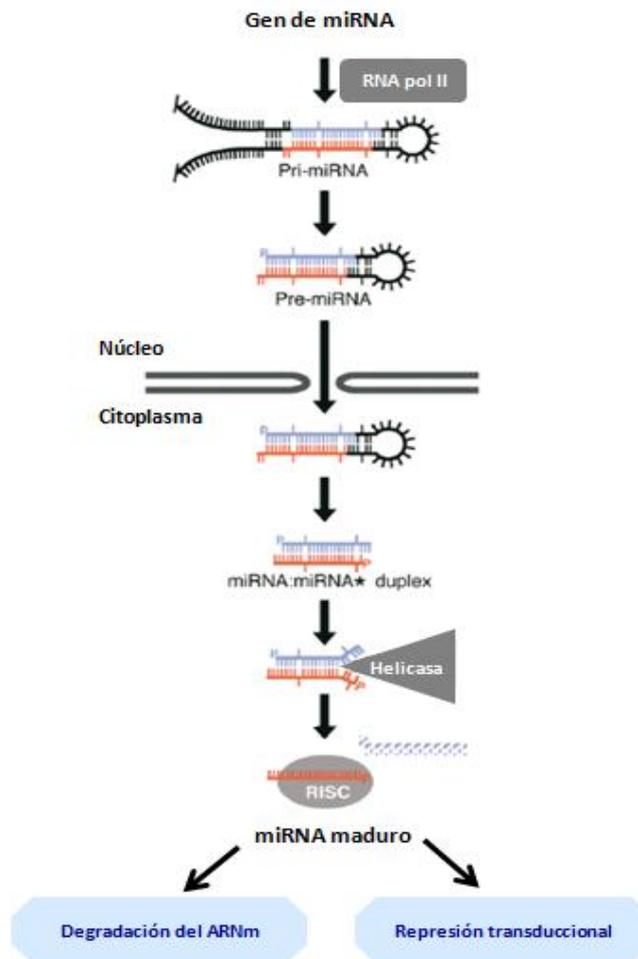


Figura 4. Esquema representativo del procesamiento de un microRNA. El microRNA (rojo) se incorpora a la encima RISC en el último paso, mientras que el microRNA* (azul) es degradado (barras azules). Un monofosfato (P) marca el extremo 5' terminal de cada fragmento (adaptada de Denli, 2004).

El primer microRNA se describió en la década de los 90. La importancia de la regulación génica dirigida por microRNAs aumenta a medida que se van descubriendo más microRNAs, y sus correspondientes dianas y funciones.

Recientemente se han mostrado evidencias de que estas moléculas pueden actuar de manera clave en procesos tales como el control de la proliferación celular o la muerte celular (79). Se ha descrito que hasta un tercio de todos los ARNm podrían ser dianas de los microRNAs (81).

Hasta la fecha, se han encontrado unas 1000 secuencias de posibles microRNAs maduros en *Homo sapiens*, propuestas bien por secuenciación, protocolos

bioinformáticos u homología con otras especies. Todas ellas se encuentran registradas en la base de datos del Instituto Sanger (<http://mirorna.sanger.ac.uk>).

6.2. microRNAs y cáncer

Las investigaciones llevadas a cabo en los últimos años sugieren firmemente que los microRNAs desempeñan un papel importante en el cáncer humano (81). Estas investigaciones han demostrado la participación de los microRNAs en la oncogénesis, debido a que pueden funcionar como genes supresores de tumores o como oncogenes en diversos tipos de tumores humanos. Por otra parte, también se ha demostrado que algunos de los genes diana regulados por microRNAs son genes conocidos implicados en la oncogénesis. Gracias a varios estudios se ha descrito que la expresión de los microRNAs es específica, no solo de tejidos, sino también de los estadios de desarrollo de los tumores, permitiendo la clasificación de los mismos y relacionándolos a su vez con sus características biológicas y clínicas (81).

Por lo tanto, las alteraciones genéticas de los microRNAs o de las dianas que regulan podrían promover o incrementar alteraciones en la expresión génica en cáncer, acelerando la transformación maligna o el crecimiento tumoral (81). A modo de ejemplo, el miR-221/222 se encuentra sobreexpresado en gliomas, lo que resulta en una activación incrementada de la ruta AKT (82). Asimismo, un estudio reciente ha descrito que miR-128 controla la angiogénesis en gliomas a través de una de sus dianas, el gen de la quinasa ribosomal S6 (*RPS6KB1*) (83).

Hasta la fecha poco se ha descrito sobre microRNAs en meningiomas. Destaca el estudio de Saydam y colaboradores, los cuales han definido un perfil de microRNAs en meningiomas benignos al comparar con tejido normal no tumoral. Dentro de este perfil identifican la represión de varios microRNAs localizados en el cromosoma 14q como miR-370, miR-654 y miR-485-5p. Igualmente, destacan el miR-200a, localizado en 1p, como el microRNA más reprimido en meningiomas. La represión de este microRNA contribuye a la tumorigénesis de los meningiomas a través de alteraciones en la ruta de señalización WNT (84).

Hipótesis y Objetivos

HIPÓTESIS

Los meningiomas son los tumores primarios más frecuentes del SNC. A pesar de que la mayoría de los meningiomas son tumores benignos de crecimiento lento, algunos de estos tumores recidivan y/o progresan, incluso tras una extirpación quirúrgica completa, comportándose, por tanto, como tumores clínicamente más agresivos. Por esta razón, la caracterización molecular mediante perfiles de expresión génica de los meningiomas y sus posibles complicaciones como son la recidiva y progresión, podría ayudar a mejorar el diagnóstico y pronóstico, identificando marcadores moleculares asociados al desarrollo y agresividad de estos tumores.

OBJETIVOS

El **objetivo general** planteado en esta Tesis Doctoral es **la identificación de marcadores diagnósticos y pronósticos asociados a meningiomas, su recidiva y progresión, que sirvan de ayuda para una mejor comprensión de las bases moleculares de estos tumores y su compartamiento clínico.**

Los objetivos concretos planteados en esta Tesis Doctoral son:

1. Identificación de genes candidatos y rutas alteradas en la patogénesis de los meningiomas a través del análisis de los perfiles de expresión génica.
2. Identificación de microRNAs asociados al desarrollo de estos tumores y su relación con la expresión génica.
3. Identificación de los genes, microRNAs y rutas alteradas asociadas a recidiva de meningioma mediante análisis del perfil de expresión génica y de microRNAs.
4. Análisis de la pérdida de 1p en recidivas de meningiomas y de su valor pronóstico.
5. Análisis de la existencia de marcadores génicos comunes entre progresión y recidiva de meningiomas.

6. Selección de moléculas candidatas (genes, microRNAs y proteínas) y validación de su expresión.

7. Análisis de la metilación como mecanismo epigenético de inactivación de genes candidatos implicados en el desarrollo de recidiva y agresividad tumoral en los meningiomas.

Materiales y Métodos

1. Procedencia de las muestras

Las muestras utilizadas en este estudio se recogieron en el Hospital Virgen de la Salud (HVS) de Toledo, en el Complejo Hospitalario Universitario de Vigo y en los Hospitales Universitarios 12 de Octubre y Ramón y Cajal de Madrid. La obtención de las muestras que no procedían del HVS se canalizó a través de solicitudes al Banco de Tumores del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) de Madrid y al Biobanco del HVS. Esta investigación ha sido aprobada por el Comité Ético del HVS.

El diagnóstico anatomopatológico se realizó en cada hospital siguiendo los criterios morfológicos, inmunofenotípicos y moleculares fijados por la clasificación actual de la OMS sobre cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina (9).

2. Pacientes y muestras

Se recogieron datos clínicos y muestras de 122 pacientes diagnosticados con un tumor meníngeo. Los datos clínicos incluyeron los siguientes parámetros: edad, sexo, localización del tumor, grado de resección y datos de seguimiento clínico, incluyendo supervivencia global y supervivencia libre de recidiva.

Este estudio incluyó un total de 129 muestras de meningioma, de los cuales se disponía de material incluido en parafina en 58 casos, material congelado en 22 casos y de ambos materiales en 49 casos. El diagnóstico anatomopatológico de estas muestras correspondía a 84 meningiomas benignos o de grado I; 37 atípicos o de grado II y 8 anaplásicos o de grado III. Las muestras fueron recogidas en el momento del diagnóstico (109 muestras) y en la recidiva o progresión del tumor (20 muestras).

Los criterios para confirmar un tumor recurrente fueron los siguientes: se consideraron aquellos pacientes en los que se realizó una extirpación macroscópicamente completa del tumor (grados I, II y III de Simpson) y en los que no se encontró evidencia de restos tumorales en imágenes de resonancia magnética (IRM) tres meses después de la cirugía, pero en los que en IRMs posteriores apareció una nueva masa en la misma localización que aumentaba progresivamente de tamaño.

3. Metodología

3.1. Extracción de ácidos nucleicos

3.1.1. Extracción de ADN

El ADN se extrajo a partir de tejido congelado. Los cortes obtenidos fueron tratados con una solución de lisis (Tris-HCl 2 M, pH 7.5, Cl₂Mg 1M) con proteinasa K (10 mg/ml). Tras una incubación del tejido a 40°C durante 12-14 horas, el ADN se purificó sucesivamente con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). El ADN obtenido se precipitó con etanol absoluto frío y se resuspendió en tampón Tris-EDTA (Tris 1 mM, pH 8.0 y EDTA 0,01 mM, pH 8.0), antes de medir su concentración y pureza.

3.1.2. Extracción ARN

La extracción de ARN total de secciones de tejido congelado se realizó mediante dos métodos. En primer lugar, para realizar estudios de expresión génica, se utilizó el reactivo Trizol (Invitrogen) y las columnas de purificación RNeasy (Qiagen). En segundo lugar, con el fin de preservar los ARNs de pequeño tamaño, los microRNAs, se utilizó el kit comercial *miRNeasy Mini Kit* (Qiagen). En ambos casos las muestras se lisan y homogenizan con una solución de fenol y tiocianato de guanidina, la cual elimina el ADN y las proteínas e inactiva las RNAsas presentes en la muestra, siguiendo las especificaciones de ambos kits.

3.1.3. Medida de calidad y concentración de ácidos nucleicos

La calidad y concentración del ADN se analizaron mediante el uso del espectrofotómetro NanoDrop-1000 (NanoDrop Technologies). La cuantificación del ADN y ARN se realizó mediante su medida a una longitud de onda de 260 nm. Para analizar la pureza del ADN o ARN, se utiliza el ratio de absorbancia entre las longitudes de onda de 260 y 280 nm. Se considera que un ADN es puro cuando se obtiene un ratio de absorbancia 260/280 de aproximadamente 1,8. Para el ARN el ratio es de 2,0. Si el ratio es sensiblemente menor o mayor en cualquiera de los dos casos, podría indicar la presencia de proteínas, fenol u otros contaminantes que absorban cerca de 280 nm.

La medida y calidad de los ARNs se realizó también mediante una electroforesis sobre chips llevada a cabo en un bioanalizador, el *Experion System* (BIO-RAD). Para el cálculo de la concentración total de la muestra se compara la muestra problema de ARN con un marcador de ARN de concentración y tamaño conocidos. La calidad del microRNA se mide con un Indicador de Calidad del ARN (*RQI, RNA Quality Indicator*) que mide la integridad del ARN comparando el electroferograma de una muestra de ARN con una serie de muestras de ARNs estandarizadas y degradadas. Con este método se obtiene un número cercano a 1 (ARN muy degradado) o a 10 (ARN de muy alta calidad); este indicador proporciona una medida imparcial de la calidad del ARN, consistente y reproducible, que determina el nivel de degradación de la muestra. Se seleccionaron aquellos casos con un valor de RQI por encima de 7 o bien un ratio de absorbancia 260/280 por encima de 1,6. Las muestras que no presentaron suficiente integridad y pureza, no fueron utilizadas para este estudio.

3.2. Análisis de microarrays de expresión génica

3.2.1. Muestras utilizadas

Para el análisis de los arrays de expresión se utilizaron 44 muestras, recogidas al diagnóstico, incluyendo 21 meningiomas benignos o de grado I, 12 atípicos o de grado II y 3 anaplásicos o de grado III. Además se incluyeron 8 muestras recogidas en la recidiva (2, 5 y 1 de grados I, II y III de la OMS, respectivamente). Como tejido control se utilizaron 3 muestras de tejido meningotelial normal no tumoral y un *pool* de meninges normales comercial (Clontech).

3.2.2. Plataforma de análisis

Para el análisis de expresión génica se utilizó la plataforma de Oligomicroarrays de Agilent Technologies (*Whole Human Genome, 1x44K*) que contiene 44.290 sondas de ADN humano, permitiendo analizar todo el genoma humano. El array está impreso en un cristal de tamaño estándar (25,4 mm por 76,2 mm).

3.2.3. Marcaje del ARN con fluorocromos

La síntesis del ARN complementario (ARNc) fluorescente se llevó a cabo a partir de 1 µg de ARN, utilizando el *kit* de amplificación *Low RNA Input Linear Amplification Kit* (Agilent Technologies). Primero se sintetizó el ADN complementario (ADNc) con una retrotranscriptasa, la enzima MMLV-RT (*Moloney Murine Leukemia Virus-Reverse Transcriptase*), y posteriormente se sintetizó el ARNc con la enzima T7-RNA polimerasa, que incorpora simultáneamente CTPs marcados con cianina-5, (Cy5, excitado 633 nm) o con cianina-3 (Cy3, excitado a 532 nm). Las muestras problema extraídas tanto de tejido tumoral como normal se marcaron con Cy5, mientras que con Cy3 se marcó un *pool* de ARN total extraído de 10 líneas celulares humanas que se utilizó como muestra de referencia en todas las hibridaciones. Finalmente, las muestras amplificadas y marcadas se purificaron con columnas *RNeasy* de Qiagen y se cuantificaron con el espectrofotómetro NanoDrop-1000.

3.2.4. Hibridación y lavados

La hibridación se realizó depositando 750 ng del ADNc marcado, y previamente desnaturalizado, sobre la cara impresa de cada uno de los cristales mediante incubación a 65°C durante 17 horas. Tras dos lavados de dos minutos con tampón SSPE (NaCl 3M, EDTA 200 mM, NaHPO 200 mM) y N-lauril sarcosina pH 7.4, y secado de los cristales con acetonitrilo, se procedió a la lectura de la fluorescencia (o escaneo de los cristales).

3.2.5. Escaneo y Lectura de fluorescencia

Los arrays fueron escaneados utilizando el escáner de microarrays 4100A de Axon (Axon Instruments). Las imágenes se analizaron con el software GenePix Pro 6.0 (Axon Instruments). Este software permite establecer plantillas de los puntos donde se leerá la fluorescencia y que contienen coordenadas para cada punto, junto con la identificación correspondiente a cada una de las sondas impresas en el array. Tras el ajuste de dichas plantillas, se recogió el dato bruto de los distintos niveles de fluorescencia a las longitudes de onda de 532 nm (Cy5) y 633 nm (Cy3) en cada punto y

se calculó la relación Cy3/Cy5. Tras una normalización de las intensidades de fluorescencia, se obtuvo una matriz numérica, para su posterior análisis.

3.2.6. Normalización de los datos

Para eliminar la variación sistemática que puede aparecer en los experimentos de microarrays se utilizó la herramienta DN MAD (*Diagnosis and Normalization of Microarray Data*) (85) que elimina las señales de fondo, y elimina las diferencias en la eficiencia de marcaje, normalizando todos los puntos del array con el método *print tip-loess* (86).

3.3. Análisis de microarrays de microRNAs

3.3.1. Muestras utilizadas

Se utilizaron 35 muestras para hibridar en arrays de microRNAs, 10 meningiomas benignos, 10 atípicos, 5 anaplásicos y 10 recidivas (5 y 5 grados I y II, respectivamente). Como tejido control se utilizó ARN procedente de 4 meninges normales. Para llevar a cabo las hibridaciones se utilizó una muestra de referencia, la cual debe ser lo más similar posible a las muestras incluidas en el estudio, y que con mucha probabilidad incluya todos los microRNAs encontrados en cualquier muestra del estudio. Esta muestra de referencia puede utilizarse como factor común sobre el que normalizar las señales de todas las muestras problema, permitiendo así una comparación directa entre ellas. Por ello la muestra de referencia incluida en este estudio es una mezcla equitativa de las muestras hibridadas en los arrays de microRNAs.

3.3.2. Plataforma de análisis

Para los análisis de expresión de microRNAs se utilizó la plataforma *miRCURY LNA microRNA arrays v1.1* (Exiqon). Esta versión contenía sondas control, tanto de expresión de microRNAs como del proceso de hibridación, y 1.273 sondas de microRNAs maduros complementarias de humanos, registrados en la base de datos *miRBase v.14.0*. El array está impreso en un cristal de tamaño estándar (25,4 mm por 76,2 mm).

3.3.3. Marcaje del ARN con fluorocromos

Antes del marcaje se llevó a cabo un tratamiento con tampón CIP (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*) para eliminar fosfatos del extremo 5' de los microRNAs. Posteriormente el marcaje se llevó a cabo sobre el extremo 3' de los microRNAs con los fluoróforos Hy3TM y Hy5TM. Las muestras problema se marcaron con Hy3 y la muestra de referencia se marcó con Hy5. Posteriormente, se detuvo la reacción y se desnaturalizaron las muestras durante 5 minutos a 95°C.

3.3.4. Hibridación y lavados

La hibridación de las muestras y de la referencia sobre los arrays se realizó a partir de 300 ng de microRNAs marcados que se incubaron durante 16 horas a 56 °C. Cada cristal se lavó con concentraciones decrecientes de soluciones salinas (citrate sódico $C_6H_5Na_3O_7$, 2X y SDS 0,2%), y un último lavado con etanol al 99%, después se secaron los cristales centrifugando a 1000 r.p.m. durante 5 minutos y se procedió a la lectura de la fluorescencia.

3.3.5. Escaneo y lectura de fluorescencia

Los cristales se escanearon y las imágenes se analizaron con el mismo escáner y software de manera similar a la de los arrays de expresión génica.

3.3.6. Normalización de los datos

Los datos de expresión obtenidos a partir de los microarrays de microRNAs de Exiqon se preprocesaron y normalizaron con la herramienta bioinformática CARMAweb (*Comprehensive R based Microarray Analysis web frontend*) (87). Primero se eliminaron las señales de fondo; después se realizó la normalización intra-array utilizando el método *print tip loess*; y por último la normalización inter-array que ajusta los valores de expresión de cada punto a través de los distintos microarrays empleados en el experimento.

3.4. Análisis bioinformático de los datos de microarrays

3.4.1. Procesamiento y análisis de datos

Una vez preprocesados y normalizados los datos de los microarrays, se analizaron con el paquete de herramientas bioinformáticas GEPAS v4.0 (<http://gepas.bioinfo.cipf.es/>) diseñado para el procesamiento y análisis de datos obtenidos a partir de microarrays (88). Se utilizaron las herramientas de preprocesado para ajustar los genes o microRNAs duplicados a su mediana, o eliminarlos si los valores de dichos replicados eran inconsistentes. Igualmente, se excluyeron del análisis los datos de genes o microRNAs sin dato de expresión en más del 70% de las muestras.

3.4.2. Agrupaciones jerárquicas

Se llevaron a cabo agrupaciones jerárquicas no supervisadas con datos de expresión génica y de microRNAs, utilizando el programa *EXPANDER 2.0 (Expression Analyzer and Displayer)* (89). El resultado de este proceso es un dendrograma donde se pone de manifiesto qué grupo de casos presentan un nivel de expresión similar para los genes estudiados.

3.4.3. Análisis funcionales

Posteriormente, se llevaron a cabo los análisis funcionales utilizando el programa *GSEA (Gene Set Enrichment Analysis v 2.0)* (90). Este programa determina si los miembros de un conjunto a priori de genes, se distribuyen al azar a lo largo de una lista ordenada de genes obtenidos de los análisis de microarrays, o si se encuentran preferentemente en la parte superior o inferior de la lista. El conjunto de genes de cada ruta molecular o grupo funcional se obtuvo de la base de datos del *Broad Institute, MsigDB (Molecular Signatures Database)* (90).

3.4.4. Bases de datos

Para obtener dianas fiables de los microRNAs analizados en este estudio, se realizó una búsqueda en tres bases de datos diferentes y se seleccionaron aquellas dianas que eran comunes en al menos 2 de ellas. Las bases de datos utilizadas fueron

las siguientes: TargetScan (<http://www.targetscan.org/>), (91), DIANA LAB (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/>), (92) y Pictar (<http://pictar.mdc-berlin.de/>), (93).

3.5. Análisis de PCR Cuantitativa a Tiempo Real (qRT-PCR)

3.5.1. Muestras utilizadas

El análisis de PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR), se llevó a cabo con 75 muestras de meningiomas, que incluían las 44 muestras hibridadas en los arrays de oligonucleótidos y las 44 muestras utilizadas en el análisis de expresión de microRNAs. Estas 75 muestras se correspondían con 31 meningiomas benignos, 19 atípicos, 6 anaplásicos, 9 meningiomas recurrentes de grado I, 9 meningiomas recurrentes de grado II y uno de grado III. Como control para el análisis de expresión génica se utilizó un *pool* de ARN procedente de varias meninges normales y para el análisis de microRNAs se utilizó la misma muestra de referencia utilizada para las hibridaciones.

3.5.2. PCR cuantitativa a tiempo real

La cuantificación relativa compara los niveles de expresión de dos genes o microRNAs de interés distintos en una misma muestra, utilizando una sonda para el gen o microRNA de interés y otra como referencia. El resultado final se expresa como un ratio de los niveles de expresión entre ambas sondas. Sin embargo, este ratio es un número relativo, sin dimensión, que sólo tiene sentido cuando se compara entre las muestras. La sonda de referencia es complementaria a un gen o microRNA que se expresa de forma constitutiva o de manera constante.

Esta sonda, conocida como control endógeno, proporciona las bases para establecer las diferencias entre muestras (Figura 5).

$$\text{Cuantificación} = \frac{\frac{\text{concentración gen interés}}{\text{concentración gen referencia}} \text{ muestra problema}}{\frac{\text{concentración gen interés}}{\text{concentración gen referencia}} \text{ muestra control}}$$

Figura 5. Esquema de la cuantificación relativa de la RT-PCR.

Para realizar el análisis de la expresión génica, primeramente debe obtenerse un ADNc. Para ello se utilizaron 5 pmoles de hexanucleótidos aleatorios, dNTPs 1 mM, 1X de tampón *First strand*, 1 mM de DTT, 2 U/ μ l de inhibidor de ribonucleasas (*RNAsin*) y 10 U/ μ l de transcriptasa *Superscript II* (Invitrogen), en un volumen final de 20 μ l. Para determinar la expresión de microRNAs específicos, se utilizó el kit *Taqman MicroRNA Reverse Transcription Kit* (Agilent Technologies), que contiene *primers* específicos para amplificar el microRNA correspondiente, además de dNTPs 1 mM, tampón RT 1X, 0,25 U/ μ l de inhibidor de RNAsas y 3,4 U/ μ l de retrotranscriptasa. La cuantificación de los niveles de ARNm se realizó mediante una activación a 25°C durante 10 minutos, la retrotranscripción inversa incubando a 42°C durante 50 minutos, y una inactivación de la reacción a 99°C durante 3 minutos. Los niveles de microRNAs se cuantificaron mediante dos incubaciones a 16°C y 42°C durante 30 minutos cada una, y una inactivación a 85°C durante 5 minutos.

Tras la retrotranscripción, se llevó a cabo una amplificación génica y de microRNAs del ADNc utilizando sondas Taqman y *Taqman Universal PCR Master Mix* que contiene todo lo necesario para llevar a cabo la reacción, siguiendo las especificaciones de la casa comercial. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y los niveles de expresión de cada gen o microRNA fueron normalizados con respecto a los controles endógenos *TBP* (Hs00427620_m1), *GAPDH* (4333764T) (expresión génica), y *RNU44* (I.D: 001094) (expresión microRNAs).

El análisis de los niveles de expresión de genes y microRNAs se realizó utilizando los aparatos *ABI PRISM 7500 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) y *Light Cycler 480 II* (Roche).

Los *primers* y sondas diana utilizados fueron los siguientes (Applied Biosystems):

Expresión génica	
<i>CTGF</i> (Hs00170014_m1)	<i>SFRP4</i> (Hs00180066_m1)
<i>LTBP2</i> (Hs00166367_m1)	<i>TGFBR3</i> (Hs0114253_m1)
<i>TMEM30B</i> (Hs01089489_s1)	<i>UCHL1</i> (Hs00985157_m1)
<i>SERPINF1</i> (Hs00171467_m1)	<i>SFRP1</i> (Hs00610060_m1)
Expresión de microRNAs	
<i>miR-200a</i> (I.D: 000502)	<i>miR-654</i> (I.D: 001611)
<i>miR-485-5p</i> (I.D: 001036)	<i>miR-330-3p</i> (I.D: 000544)
<i>miR-30a-5p</i> (I.D: 000417)	<i>miR-302a</i> (I.D: 000529)
<i>miR-545</i> (I.D: 002267)	<i>miR-513a-5p</i> (I.D: 002090)
<i>miR-370</i> (I.D: 002275)	

Tabla 3. Sondas Taqman utilizadas en este estudio con su correspondiente identificación (Applied Biosystems).

3.6. Análisis de metilación del ADN

Se estudió el estado de metilación de dos genes, *UCHL1* y *SFRP1*, mediante PCR específica de metilación (*Methylation Specific PCR, MS-PCR*) y secuenciación directa de muestras tratadas con bisulfito (*Bisulfito Sequencing Analysis, BSA*).

3.6.1. Muestras utilizadas

En los análisis de metilación se incluyeron 54 muestras de meningiomas, 30, 13 y 3 meningiomas benignos, atípicos y anaplásicos, respectivamente, 8 recidivas (4 de grado I y 4 de grado II), y dos muestras de meninge normal no tumoral. Como control de metilación se utilizó ADN de sangre periférica tratado *in vitro* con la metilasa M. SssI (New England Biolabs) que metila todos los residuos de citosina de los dinucleótidos CG, que encuentra dentro de una secuencia de doble cadena. Dicha reacción se lleva a cabo incubando 5µg de ADN con la enzima y los tampones específicos a 37°C durante 4 horas.

3.6.2. Tratamiento del ADN con bisulfito sódico

El tratamiento del ADN con bisulfito sódico convierte todas las citosinas de los dinucleótidos CG que no están unidas a un grupo metilo (no metiladas), en uracilos, dejando intactos los dinucleótidos CG cuya citosina aparece unida a un grupo metilo (metiladas). De esta manera, pueden diseñarse *primers* específicos que permitan la amplificación tanto del ADN metilado (M), como del ADN no metilado (UM). Esta técnica se conoce como PCR específica de metilación o *MS-PCR*, *methylation-specific PCR*. Por otro lado también se puede analizar la secuencia de ADN tratada con bisulfito (BSA) mediante secuenciación directa.

Para llevar a cabo la modificación del ADN con bisulfito se utilizó el kit *EpiTect Bisulfite* (Qiagen). La conversión de las citosinas no metiladas se consiguió incubando 1 µg de ADN a altas concentraciones de bisulfito sódico, alta temperatura y pH bajo, según las especificaciones del kit. Después, se purificó el ADN ya modificado para eliminar sales de bisulfito y otros agentes químicos utilizados en el proceso de conversión que podrían interferir en la amplificación o secuenciación.

3.6.3. PCR específica de metilación (MS-PCR)

Los genes *UCHL1* y *SFRP1* se analizaron utilizando dos parejas de *primers* específicos, una para el ADN metilado y otra para el ADN no metilado. Las secuencias de *primers* y el tamaño esperado de los productos de amplificación se detallan en la Tabla 4. La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen de 20 µl, a partir de 50 ng de ADN modificado con bisulfito sódico, en una solución con dNTPs 0,25 mM, MgCl₂ 2,5 mM, 0,5 µM de cada primer, 0,2 U de polimerasa *Amplitaq Taq Gold* y el tampón *Gold* específico de la enzima (Applied Biosystems).

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: una activación enzimática por incubación a 95°C durante 5 minutos, seguida de 30 o 40 ciclos que consistían en 30 segundos de desnaturalización a 95°C, 30 segundos de anillamiento a 60°C o 62°C y una extensión de 30 segundos a 72°C. Por último, se realizó una elongación final a 72°C durante 5 minutos (Tabla 4). Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 3%, teñidos con bromuro de etidio.

Las reacciones se realizaron por duplicado para asegurar resultados consistentes y reproducibles.

		<i>Primers</i>	Longitud del producto (pb)	Tª anillamiento (°C)	Nº ciclos
MS-PCR	SFRP1	M 5'-TGTAGTTTTCGGAGTTAGTGTGCGGC-3' 5'-CCTACGATCGAAAACGACGCGAACG-3'	126	60	30
		UM 5'-GTTTTGTAGTTTTGGAGTTAGTGTGTGT-3' 5'-CTCAACCTACAATCAAAAACAACACAAACA-3'	126	60	30
	UCL1	M 5'-TCGTATTTATTTGGTCGCGATC-3' 5'-CTATAAACGCCGACCAAACG-3'	100	62	40
		UM 5'-GGTTTGTATTTATTTGGTTGTGATT-3' 5'-CAACTATAAACACCAACCAAACA-3'	106	60	30
SECUENCIACIÓN	SFRP1	5'-GGGGATYGGGTAGTAGTTT-3' 5'-ACAACACCATCTTCTTATAACCC-3'	388	60	35
	UCL1	5'-AGTGAGATTGTAAGTTTGG-3' 5'-CACTCACTTTATTCAACTCTAA-3'	386	62	35

Tabla 4. Secuencias de primers utilizadas en MS-PCR y Secuenciación del ADN modificado con bisulfito.

3.6.4. Secuenciación del ADN tratado con bisulfito.

El estado de metilación del ADN fue analizado también mediante secuenciación directa del ADN tratado con bisulfito utilizando *primers* específicos para cada gen (Tabla 4). Los *primers* utilizados para analizar la región promotora de *UCL1* habían sido descritos previamente (94). Los *primers* utilizados para el análisis del promotor de *SFRP1* se diseñaron con el programa *MethPrimer* (<http://www.urogene.org/methprimer>).

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos que consistían en una desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, un anillamiento a 60°C o 62°C durante 30 segundos y una extensión a 72°C durante 30 segundos, incluyendo una elongación final a 72°C durante 7 minutos.

Los productos de PCR fueron purificados y clonados en el vector *pGEM-T System II* (Promega). Este vector es un vector lineal con un residuo terminal de timina en ambos extremos. Estos residuos de timina proporcionan unos extremos compatibles para la unión de los productos de amplificación y mejoran la eficacia de ligación evitando la recircularización del vector (Figura 6).

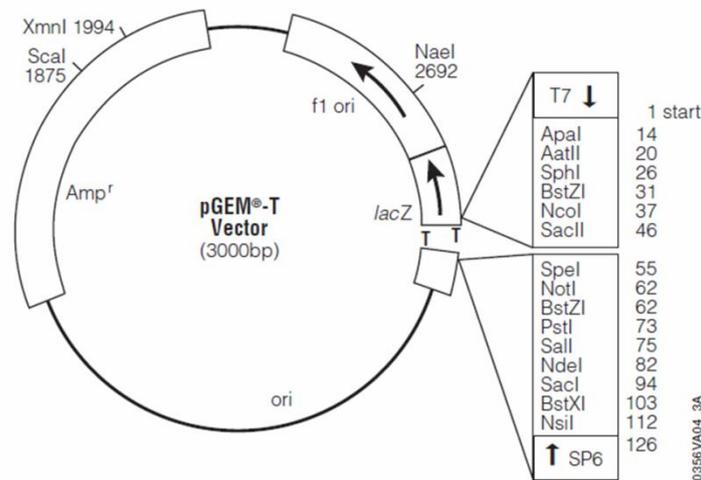


Figura 6. Mapa del vector *pGEM-T* y puntos de referencia de la secuencia.

El primer paso para la clonación del fragmento amplificado es la ligación de este fragmento en el vector *pGEM-T*, mediante una incubación a 4°C durante toda la noche con la enzima T4 DNA ligasa en el tampón correspondiente (Promega). Como control negativo de ligación se utilizó un fragmento de ADN de 542 pb y que contiene múltiples codones *stop*, proporcionado junto con el vector *pGEM-T* (Promega). Tras la ligación, se añadieron 2 µl de la reacción de ligación a 50 µl de células competentes de alta eficiencia *JM109* (*E. coli*), y se llevó a cabo la transformación mediante choque térmico a 42°C durante 45 segundos. Las células se incubaron en 900 µl de medio LB-agar a 37°C durante una hora y media con agitación, después se sembraron 100 µl de esta reacción en placas de LB suplementadas con ampicilina y se incubaron a 37°C toda la noche en estufa.

La selección de células transformadas con el vector y el fragmento del producto de interés, se realizó en función del distinto tamaño de amplificación del vector con y sin inserto en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. La reacción de

amplificación se llevó a cabo seleccionando varias colonias y amplificándolas con tampón Gold, dNTPs 0,2 mM, MgCl₂ 1,5 mM, 1,5 U de enzima *AmpliTaq Gold* y los primers M13, específicos del vector (Applied Biosystems). Las condiciones de amplificación de las colonias fueron las siguientes: una activación enzimática a 94°C durante 10 minutos, seguida de 35 ciclos que consistían en una desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, un anillamiento a 55°C durante 1 minuto y una elongación a 72°C durante 1 minuto, con un paso final de extensión a 72°C durante 10 minutos. El tamaño del vector es de, aproximadamente, 200 pb, mientras que vector junto con el inserto suman unas 600 pb de bases, en ambos casos (*SFRP1* y *UCHL1*).

Se seleccionaron, entre 3 y 5 clones de cada muestra y se realizó una amplificación específica de secuenciación siguiendo las recomendaciones de Applied Biosystems: una desnaturalización inicial a 96°C durante 1 minuto, seguido de 25 ciclos que consistían en 10 segundos a 96°C y 4 minutos a 50°C. Posteriormente, las muestras se analizaron en el Sistema Automático de Secuenciación de ADN, *ABI PRISM 310* (Applied Biosystems).

3.7. Matrices de Tejido y Técnicas de Inmunohistoquímica

Las matrices de tejidos son bloques de parafina en los cuales se incluyen cilindros separados de distintas muestras, lo que permite su análisis simultáneo.

Para construir las matrices de tejidos se utilizaron pequeños cilindros de tejido incluido en parafina (0,4-0,6 mm de diámetro) de las muestras que se van a estudiar (bloques donadores), y se colocan de forma ordenada en un bloque de parafina nuevo (bloque aceptor). Este bloque aceptor, con todas las muestras de interés, se corta con un microtomo, y las secciones obtenidas se colocan en portaobjetos para su posterior análisis (Figura 7).

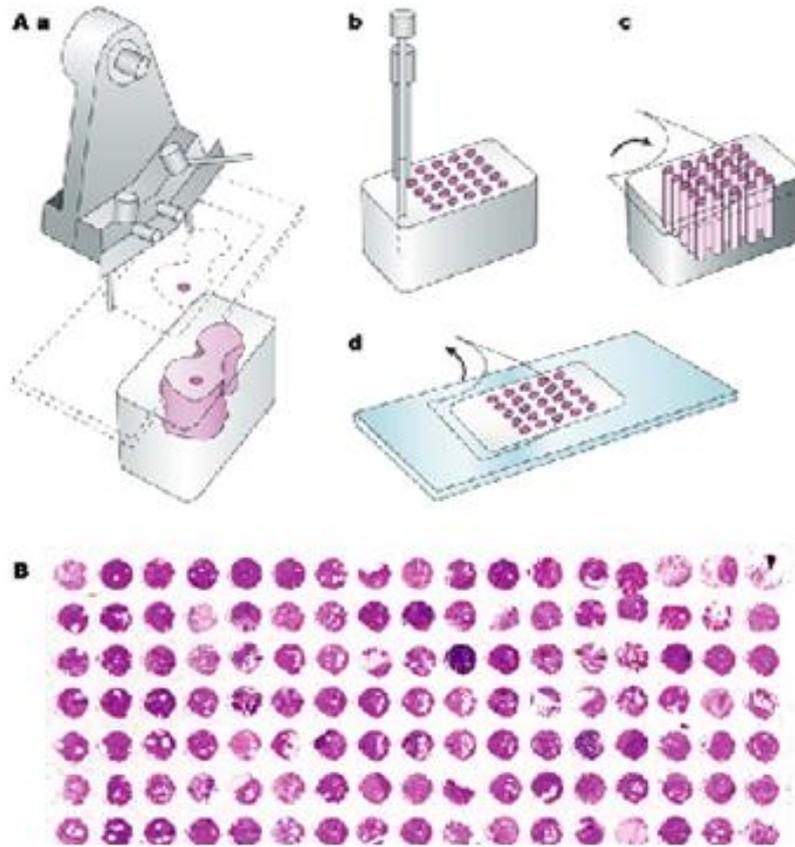


Figura 7. Diseño de una matriz de tejidos. **A:** secciones cilíndricas de tejido (0,6 mm de diámetro) se recogen de un bloque convencional de parafina (bloque donador) utilizando un *tissue microarrayer*; y se colocan en agujeros previamente hechos en un bloque receptor de parafina vacío. **B:** Sección de una matriz de tejido teñida con hematoxilina y eosina; adaptada de Sauter (95).

Se seleccionaron áreas morfológicamente representativas de cada tumor con tinciones de hematoxilina y eosina de cada bloque de parafina. Se utilizó un *Tissue Microarrayer* (Beecher) para construir las matrices con bloques de tejidos incluidos en parafina tal y como se ha descrito previamente (96). Con este aparato se crea una matriz regular de agujeros en un bloque de parafina receptor en la que posteriormente se colocan cilindros de 4 μm de diámetro de las regiones seleccionadas de las muestras por duplicado.

3.7.1. Muestras utilizadas

Las matrices de tejido se llevaron a cabo seleccionando 105 muestras obtenidas de bloques incluidos en parafina. Estas muestras incluían 74 meningiomas benignos, 28 atípicos y 3 anaplásicos, siendo 9 de estas muestras, recidivas. En las matrices de tejido se incluyeron, como tejido control, muestras de cerebro, amígdala y meninges normales.

3.7.2. Tinción inmunohistoquímica

Para la tinción inmunohistoquímica se cortaron secciones de 2 a 4 μm de grosor de las matrices de tejido que se desparafinaron con xilol, se rehidrataron con alcohol y se sometieron a eliminación antigénica mediante cocción a 95 °C en una solución de citrato sódico 10mM a pH 6.0 o pH 10 dependiendo del anticuerpo. Tras enfriar los cristales y tratarlos con una solución de bloqueo con peroxidasa (Dako) durante 5 minutos, dichos cristales se tiñeron con el anticuerpo monoclonal específico y se contratiñeron con hematoxilina.

Para los distintos estudios se seleccionaron una serie de anticuerpos primarios frente a las proteínas de interés. Los anticuerpos primarios utilizados fueron:

Anticuerpo	Casa comercial	Dilución
MIB-1	Dako	1:50
CCND1	LabVision Noemarkers	1:100
HES7	Sta. Cruz	1:25
CDH1	Dako	1:50
LMO4	LifeSpan BioSciences	1:1000
CKS2	Sigma-Aldrich	1:200
HIST1H1C	Sigma-Aldrich	1:100

Tabla 5. Anticuerpos, casa comercial de procedencia y diluciones de los diferentes anticuerpos utilizados para las tinciones inmunohistoquímicas.

Los tumores se clasificaron como positivos si la tinción nuclear o citoplasmática se observó en más del 5% de las células, o negativos si dicha tinción se observó en menos del 5% de las células analizadas.

Para el caso de la *HIST1H1C*, se analizaron secciones completas de tejido tumoral en ciertos casos, debido a que la tinción de dicho anticuerpo se daba de forma local.

La expresión del marcador de proliferación Ki-67 (anticuerpo MIB-1) se determinó en al menos 10 campos de alta resolución (40x). Los tumores fueron clasificados como positivos (MIB-1 alto) cuando presentaron tinción en más del 4% de las células y negativos (MIB-1 bajo) cuando presentaron tinción en menos del 4% de las células basándonos en estudios previos (97).

3.8. Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

Para determinar el número de copias del cromosoma 1p en meningiomas se realizaron análisis de hibridación *in situ* fluorescente (FISH), utilizando la sonda LSI 1p36/1q25 (Vysis Inc.). Esta sonda permite evaluar el estado de las regiones de los cromosomas 1p36 y 1q25. En una célula normal hibridada con la sonda LSI 1p36/1q25, se observarán dos señales rojas y dos verdes, lo que es indicativo de dos copias intactas del cromosoma 1. Sin embargo, en una célula anormal, con una delección en la región 1p36, se observará una señal roja y dos verdes.

Para llevar a cabo la hibridación *in situ* fluorescente, las secciones de las matrices de tejidos se incubaron a 65°C toda la noche, se desparafinaron incluyendo las secciones en xilol a 65°C, durante 50 minutos y se deshidrataron con concentraciones decrecientes de etanol. Tras ser lavadas con agua, y tratadas con calor y EDTA 250 mM, pH 8.0, se realizó una digestión con pepsina. La digestión se detuvo con tampón fosfato salino y MgCl₂ 50 mM. Primeramente se incubaron las secciones a 73°C durante 5 minutos para desnaturalizar la sonda, y después se hibridaron a 37°C toda la noche en cámara húmeda.

Los cristales se lavaron con 0,4X de una solución de sal de citrato de sodio (SSC) y NP₄O 0,3% a 75°C durante 2 minutos y después se lavaron con SSC 2X y NP₄O 0,1% durante 1 minuto a temperatura ambiente, antes de contrateñir con DAPI.

Las señales de fluorescencia se observaron con el microscopio de fluorescencia de Olympus BX61. Se analizaron para cada muestra, aproximadamente 130 núcleos bien definidos y no solapantes. Se consideró pérdida del cromosoma 1p, cuando se observó un desequilibrio de 1 señal de 1p (roja) frente a 2 señales de 1q (verde), en más de un 25% de células tumorales.

3.9. Análisis estadísticos

Se utilizaron los test de Fisher y de Chi-cuadrado para determinar la significación estadística de las diferencias observadas entre grupos (variables cualitativas). Las curvas de supervivencia se trazaron de acuerdo con el método de Kaplan-Meier y se utilizó la prueba *log-rank* para establecer la significación estadística de las diferencias entre las curvas. El umbral de significación estadística se estableció en $P < 0,05$, para todos los casos.

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa estadístico *Statistical Package for the Social Science v17.0 (SPSS, Chicago, IL)*, para correlacionar los resultados obtenidos con otros parámetros clínicos o moleculares, como el análisis de las diferencias en la supervivencia libre de recidiva (SLR) basadas en: la pérdida del cromosoma 1p, la clasificación de los pacientes de acuerdo a los resultados de la agrupación jerárquica de las 44 muestras de meningiomas y la expresión génica media del gen *CKS2*.

4. Muestras de otros estudios

Se recogieron datos de expresión génica de la base de datos de *Gene Expression Omnibus (GEO)*, (*National Center for Biotechnology Information, NCBI*). Los datos de expresión recogidos proceden de dos estudios de meningiomas de los autores Keller y colaboradores (74) y Lee y colaboradores (70).

En total se recogieron datos de expresión de 92 meningiomas, correspondientes a 53 meningiomas benignos, 22 atípicos, 14 anaplásicos, incluyendo 16 muestras de meningiomas originales que han recidivado y/o recidivas, y 3 muestras sin datos clínicos ni histopatológicos.

Por otro lado se recogieron los perfiles de expresión de meningiomas procedentes de otros autores (63, 70, 73-75, 77, 98) para comparar dichos perfiles con los perfiles de expresión obtenidos en este estudio (Tabla 6).

Año	Autor	Grados OMS (Nº de tumores)	Nº de GDEs	Nº genes estudiados
2005	Wrobel y col.	I (13) vs. II-III (17)	64	4.211
2005	Lusis y col.	I (No dato) vs. III (No dato)	54	39.000
2007	Carvalho y col.	I (8) vs. III (8)	192	47.400
2009	Keller y col.	I (8) vs. II & III (16)	1157	55.000
2009	Fevre-Montange y col.	I (7) vs. II, III & R (10)	250	55.000
2010	Lee y col.	I, II & III (68)	-	47.400
2010	Perez-Magan y col.	I & II (33) vs. R (7)	425	44.290

Tabla 6. Estudios de microarrays de ARNm de meningiomas humanos utilizados para el análisis. GDEs: genes diferencialmente expresados; **I, II o III:** grados I, II o III, de la OMS, respectivamente; **R:** recidivas.

Resultados

1. Descripción de la serie

La serie de meningiomas utilizada en este estudio estaba compuesta por 129 muestras procedentes de 122 pacientes. La información clínica de la que se disponía fue la siguiente: treinta y ocho pacientes eran hombres y 87 eran mujeres; la edad media en el momento de la operación era de 60,2 años (rango: 16-88 años). El grado de resección en fue total en 104 casos (grados I, II y III de la escala Simpson) y subtotal en 19 casos (grados IV y V de la escala Simpson); los pacientes recidivaron después de un tiempo medio de 54,6 meses (rango de 3 a 308 meses) tras la cirugía, Tabla 7.

	MUESTRAS AL DIAGNÓSTICO			MUESTRAS EN LA RECIDIVA		
	Grado I	Grado II	Grado III	Grado I	Grado II	Grado III
Nº muestras	75	27	7	9	9	2
Edad media (rango)	59 (16-88)	66 (32-87)	62 (42-78)	57 (21-73)	61 (44-73)	37
Mujeres/hombres	20/54	19/7	3/4	5/4	5/2	1
Grado de resección						
Total	60	24	6	7	6	1
Subtotal	14	2	-	2	-	1
Localización						
Convexidad	36	15	6	6	7	1
Base	30	6	-	3	1	-
O que R	8	4	4			
SLR (meses)	58	38	23	53	40,5	48

Tabla 7. Resumen de la información clínica disponible de los pacientes. O que R: muestras al diagnóstico que posteriormente han recidivado. **SLR:** supervivencia libre de recidiva.

2. Perfil de expresión génica y de microRNAs en el desarrollo de meningiomas

2.1. Firma molecular de meningiomas

Se han comparado los perfiles de expresión génica de los meningiomas con el del tejido meníngeo normal para identificar genes asociados al desarrollo y patogénesis de los meningiomas. Estos análisis han permitido obtener un perfil de expresión génica formado por 2.870 genes y ESTs, *expressed sequence tags*, alterados en meningiomas ($FDR \leq 0,05$). De éstos, se seleccionaron 438 y 205 genes reprimidos y sobreexpresados respectivamente, más de 2,5 veces por debajo y por encima de los niveles medios de expresión del tejido normal ($\log_2 \leq 0 > 1,3$). Cabe resaltar que la

mayoría de los genes de la firma molecular estaban reprimidos en los meningiomas (68,1% reprimidos frente al 31,9% sobreexpresados).

Se ha utilizado el programa estadístico *GSEA* para identificar las rutas significativamente alteradas en meningiomas ($FDR \leq 0,25$). Este análisis reveló una única ruta sobreexpresada estadísticamente significativa: la fosforilación oxidativa. Por otro lado, también se identificaron 9 rutas reprimidas en meningiomas. Las rutas reprimidas encontradas son: cascadas de complemento y coagulación, ruta de factores de transcripción relacionados con hematopoyesis, y rutas de señalización como PDGF, TGF- β , EGFR, MAPK, NOTCH, CXCR4 y NF- $\kappa\beta$ (Figura 8). La Tabla 8 muestra los genes más representativos implicados en los meningiomas, agrupados por la ruta en la que participan.

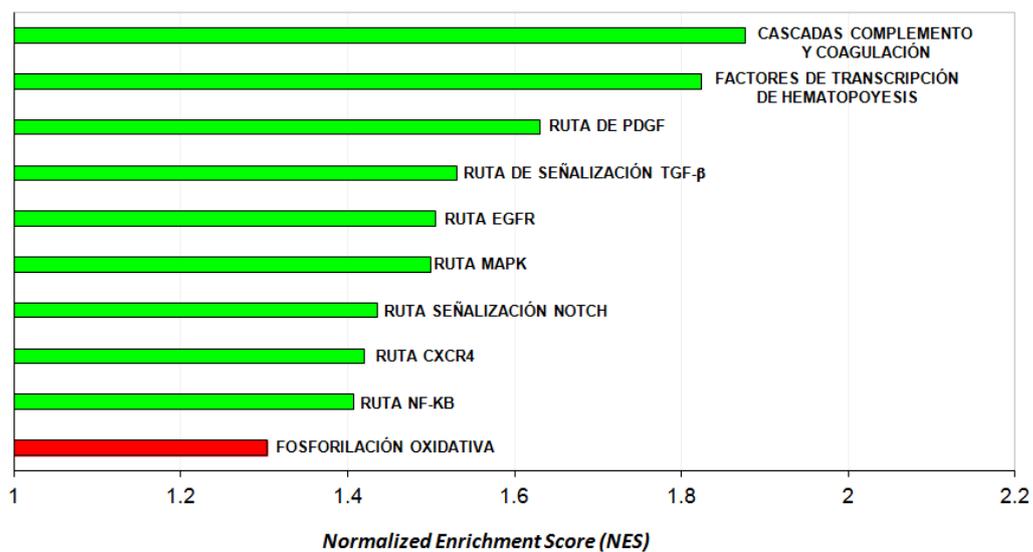


Figura 8. Rutas moleculares alteradas en meningiomas, ordenadas por el *Normalized Enrichment Score (NES)*. Este valor refleja el grado en el que un conjunto específico de genes están representados en los extremos (parte superior o inferior) de una lista de genes ordenada en función de la expresión génica. Rutas moleculares reprimidas y sobreexpresadas en verde y rojo, respectivamente ($FDR < 0,25$).

	Promedio tumores	Grado I	Grado II	Grado III	Chr	Descripción
Cascadas de complemento y coagulación						
<i>TFPI</i>	-1,94	-1,98	-1,93	-1,76	2q32	Inhibidor de la ruta del factor tisular
<i>VWF</i>	-1,91	-2,12	-1,60	-2,10	12p13	Factor von Willebrand
<i>C1R</i>	-1,81	-1,83	-1,58	-3,07	12p13	Componente R1 del complemento
<i>F13A1</i>	-1,85	-1,74	-1,83	-2,92	6p25	Factor de coagulación tipo XIII
<i>PLAT</i>	-2,15	-2,15	-1,99	-3,11	8p11	Activador tisular del plasminógeno
<i>THBD</i>	-1,59	-1,83	-1,32	-1,34	20p11	Trombomodulina
F. transcripción hematopoyesis						
<i>HHEX</i>	-1,51	-1,15	-1,93	-1,71	10q23	Factor de transcripción de la familia <i>homeobox</i>
<i>MAFB</i>	-1,51	-1,35	-1,67	-1,80	20q12	Oncogen homólogo de v-maf
<i>ETS2</i>	-2,01	-1,81	-2,17	-2,60	21q22	Oncogen homólogo del virus E26
<i>LMO2</i>	-1,64	-1,75	-1,50	-1,63	11p13	Proteína con dominio LIM2
<i>FLI1</i>	-1,55	-1,13	-1,90	-2,61	11q24	Protooncogen FLI
<i>LHX2</i>	-1,33	-1,12	-1,60	-1,36	9q33	Proteína de dominio LIM2
Ruta PDGF						
<i>PDGFRA</i>	-1,62	-1,46	-1,90	-1,18	4q12	Receptor del PGF alfa
<i>STAT1</i>	-1,80	-1,79	-1,66	-2,70	2q32	Activador de transcripción 1
<i>STAT3</i>	-1,46	-1,56	-1,19	-2,31	17q21	Activador de transcripción 3
Ruta TGF-β						
<i>THBS1</i>	-2,05	-1,81	-2,26	-2,62	15q14	Trombospondina 1
<i>TGFBR2</i>	-1,74	-1,58	-1,73	-2,99	3p24	Receptor B2 del TGF
<i>RUNX2</i>	-1,77	-1,36	-2,18	-2,47	6p12	Factor de transcripción 2 asociada a <i>runt</i>
<i>SMAD1</i>	-1,47	-1,22	-1,61	-2,49	4q31	Miembro 1 de la familia SMAD
Ruta EGFR						
<i>STAT1</i>	-1,80	-1,79	-1,66	-2,70	2q32	Activador de transcripción 1
<i>STAT3</i>	-1,46	-1,56	-1,19	-2,31	17q21	Activador de transcripción 3
Ruta MAPK						
<i>CASP7</i>	-1,99	-1,86	-1,96	-3,07	10q25	Caspasa 7
<i>TGFBR2</i>	-1,74	-1,58	-1,73	-2,99	3p24	Receptor B2 del TGF
<i>FGF13</i>	-1,52	-1,45	-1,52	-2,02	Xq26	Factor de crecimiento de los fibroblastos 13
<i>ATF4</i>	-1,43	-1,51	-1,14	-2,54	22q13	Factor activador de la transcripción 4
<i>PPM1A</i>	-1,41	-1,21	-1,65	-1,52	14q23	Fosfatasa 1A, isoforma alfa
<i>PPP3CC</i>	-1,59	-1,45	-1,64	-2,43	8p21	Subunidad catalítica de la fosfatasa 3
<i>CASP10</i>	-1,55	-1,70	-1,36	-1,61	2q33	Caspasa 10
<i>MAPK14</i>	-1,42	-1,29	-1,40	-2,54	6p21	Quinasa activada por mitógeno 14
Ruta NOTCH						
<i>SNW1</i>	-1,41	-1,22	-1,40	-2,85	14q24	Proteína con dominio 1 SNW
<i>DLL1</i>	-1,57	-1,29	-1,72	-2,81	6q27	Proteína tipo delta 1
<i>CREBBP</i>	-1,59	-1,46	-1,60	-2,55	16p13	Proteína de unión a CREB
<i>HES7</i>	1,53	1,62	1,30	2,29	17p	Hairy and enhancer of split 7

	Promedio tumores	Grado I	Grado II	Grado III	Chr	Descripción
Ruta CXCR4						
<i>CXCL12</i>	-2,23	-2,27	-2,10	-2,67	10q11	Factor derivado de células estromales
<i>PRKCB1</i>	-1,80	-1,63	-2,01	-1,91	16p12	Proteína kinasa C, beta 1
Ruta NF-KB						
<i>TNFAIP2</i>	-2,59	-2,60	-2,52	-2,96	14q32	Proteína alfa-inducida 2 del TNF
<i>BCL3</i>	-2,25	-2,47	-2,09	-1,49	19q13	Proto-oncogen BCL3
<i>TNFRSF25</i>	-1,54	-1,18	-1,88	-2,29	1p36	Miembro 25 de la familia de receptores de TGF- β
<i>LYN</i>	-1,53	-1,32	-1,75	-1,78	8q12	Oncogen homólogo de sarcoma viral v-yes-1
<i>VCAM1</i>	-1,66	-1,30	-1,94	-2,66	1p21	Molécula de adhesión celular vascular 1
<i>RELB</i>	-1,32	-1,44	-1,38	-0,05	19q13	Factor de transcripción REL-bB
<i>APOL3</i>	-2,37	-2,36	-2,28	-3,03	22q12	Apolipoproteína L3
<i>PLCG2</i>	-1,47	-1,08	-1,82	-2,41	16q23	Fosfolipasa C, subunidad gamma2
<i>TNFSF10</i>	-1,76	-1,70	-1,73	-2,35	3q26	Miembro 10 de la superfamilia del TNF
Fosforilación oxidativa						
<i>COX6A1</i>	1,42	0,95	1,95	1,93	12q24	Polipéptido 1 de citocromo oxidasa 1
<i>COX6A2</i>	1,36	1,44	1,08	2,41	16p11	Polipéptido 2 de citocromo oxidasa 2

Tabla 8. Genes alterados en meningiomas agrupados en función de la ruta a la que están asociados. En la tabla se muestran el nivel promedio de expresión de todos los tumores (\log_2); los niveles de expresión medios de los distintos grados tumorales (\log_2); las localizaciones cromosómicas, **Chr**, y una breve descripción del gen.

2.2. Perfil de expresión de microRNAs en meningiomas

Para determinar el papel de los microRNAs en el desarrollo de los meningiomas, se comparó la expresión de microRNAs de 35 muestras tumorales con la de 4 muestras de meninges no tumorales. La comparación estadística de ambos grupos permitió obtener 46 microRNAs que se expresaban diferencialmente con un nivel de significación $FDR \leq 0,05$. De estos, el 24% (11/46) y el 60,8% (28/46) estaban reprimidos o sobreexpresados respectivamente, 2 veces por debajo y por encima con respecto al tejido normal.

Por otro lado se han realizado distintas comparaciones para determinar la expresión de microRNAs entre los distintos grados de meningiomas, pero no se han obtenido microRNAs diferencialmente expresados ($FDR > 0,05$).

2.3. Correlación entre la expresión génica y la expresión de microRNAs

Para identificar las dianas reguladas por microRNAs se buscaron aquellas comunes en al menos dos bases de datos. Posteriormente, se intentó determinar si entre las dianas génicas reguladas por los microRNAs alterados en meningiomas, formaban parte de la firma molecular de meningiomas. Este análisis permitió identificar 87 genes de la firma de meningiomas entre las dianas reguladas por 23 de los microRNAs alterados en meningiomas.

Cuatro de estos 23 microRNAs, reprimidos en meningiomas tienen como diana 21 genes presentes en el perfil de expresión génica, 15 de ellos reprimidos y 6 sobreexpresados. Por otro lado, 19 microRNAs sobreexpresados en meningiomas tienen como dianas 53 genes reprimidos y 13 sobreexpresados en estos tumores (Tabla 9). Entre los microRNAs alterados cabe destacar el miR-1471, que regula el gen *HES7* (*hairy and enhancer of split 7*), represor transcripcional asociado a la ruta NOTCH, y miR-302a que regula el gen de la ciclina D1. Por otra parte, existen varios genes que se encuentran regulados por más de un microRNA. Tales como *CREBBP* regulado por miR-330-3p y miR-381; *KREMEN1* regulado por miR-302a, miR-220b y miR-1205; o *TGFBR2* regulado por miR-302a y miR-145.

<i>microRNAs reprimidos</i>	Genes asociados a meningioma regulados por microRNAs
miR-548e	<i>MAFB, TRMT5, SLC4A4, PTBP2, MAF, RICTOR, MAF, ZFAND5, PTPLAD1, ZFP36L1, MBD2, ERG, LLGL2, HMG2, SPSB1, LHX2, GLCE, ARHGAP26</i>
miR-874	<i>PCTK1</i>
miR-1225-3p	<i>FTH1</i>
miR-1471	<i>HES7, MAFB</i>
<i>microRNAs sobreexpresados</i>	
miR-410	<i>CPEB4●</i>
miR-330-3p	<i>ANTXR2, CREBBP●, ITPK1, LHX6●, LYN, PRKCB1, ZNF410</i>
miR-302a	<i>CCND1, CD44, CYP26B1●, DAZAP2, GLCE, GUCY1A3, KREMEN1●, LHX6●, MBD2, NPAS3, PDCD4●, RRAGD, RUNX2, SASH1, SIRPA, SNX21●, TGFB2●</i>
miR-220b	<i>KREMEN1●</i>
miR-145	<i>ARHGAP26, ERG, FLI1, PDCD4●, ST6GALNAC3, TGFB2●</i>
miR-523	<i>MAFB●, KIF5C●, IER5●</i>
miR-381	<i>CREBBP●, FUSIP1, HMG2, IER5●, MTSS1, NFYB, NRP1●, TLN2, YTHDF1</i>
miR-411*	<i>CPEB4●, SF3B3, ZFAND5●</i>
miR-1205	<i>CDV3, C1orf21, S100A8, KIF5C●, ZFAND5●, RAPH1, F13A1, KREMEN1●, SETD3, PHF21A●, CPEB4●, NCKIPSD, SPOCK1, PPP1R16B</i>
miR-1296	<i>ZNF521</i>
miR-129-5p	<i>MAN1A1, PHF21A●, PIPNA, ZFP36L1</i>
miR-1234	<i>PAK6●</i>
miR-299-5p	<i>ACSL1, PPP2R5A, MAT2A</i>
miR-621	<i>EIF2C4</i>
miR-889	<i>CYP26B1●, HRB, MAFB●, MMD</i>
miR-185*	<i>MAPK14, PAK6●, HCN4</i>
miR-637	<i>CPLX2</i>
miR-1304	<i>EFEMP2, PSCD1, SNX21●</i>
miR-628-3p	<i>NRP1●</i>

Tabla 9. Asociación entre microRNAs alterados en meningioma y sus correspondiente dianas de la firma de meningiomas. MicroRNAs reprimidos y sobreexpresados que regulan genes identificados en la firma de meningiomas (en verde y rojo genes reprimidos y sobreexpresados, respectivamente). ●: genes regulados por más de un microRNA.

2.4. Validación de genes y microRNAs candidatos asociados al desarrollo de los meningiomas

Se han seleccionado tres genes y dos microRNAs de los identificados en la firma de meningiomas para su validación. Los genes *CCND1* (*cyclin D*) y *CDH1* (*e-cadherin*) se han seleccionado por su asociación con la ruta WNT; el gen *HES7* por su asociación con la ruta NOTCH; y los microRNAs miR-330-3p y miR-302a, ya que las posibles dianas génicas que regulan se han identificado en la firma de meningiomas.

2.4.1. Validación de la expresión de microRNAs mediante qRT-PCR

Los análisis de expresión realizados mediante qRT-PCR del miR-330-3p y miR-302a, confirmaron los niveles de expresión obtenidos mediante microarrays (Tabla 10). En ambos casos se observó la sobreexpresión de los microRNAs en los tumores con respecto al tejido control.

microRNA	Datos microarrays		Datos RT-PCR	
	Nivel expresión N vs. T	FDR	Nivel expresión N vs. T	p-valor
miR-330-3p	2,09	0,024	5,41	< 0,05
miR-302a	2,09	0,009	2,82	< 0,05

Tabla 10. Niveles medios de expresión de microRNAs en tejido tumoral (n=30) normalizados con tejido normal (n=4) (N vs. T) calculados con dos métodos distintos. La significación estadística se estableció con los valores *FDR* y *p-valor* (< 0,05).

2.4.2. Análisis de la expresión proteica de marcadores candidatos mediante estudios de inmunohistoquímica

Los análisis de microarrays mostraron sobreexpresión de los genes *CCND1*, *HES7* y *CDH1* en meningiomas. La validación de estos resultados se realizó mediante análisis de su expresión proteica. Los resultados inmunohistoquímicos de los marcadores *CCND1*, *HES7* y *CDH1* revelaron tinción nuclear en *CCND1* y *HES7*, y tinción citoplasmática para *HES7* y *CDH1* (Figura 9). Estos análisis inmunohistoquímicos mostraron niveles de expresión de estas proteínas concordantes con los detectados mediante los análisis de microarrays. En la Tabla 11 se muestran los resultados de la expresión proteica globales y también desglosados en función del grado, observándose una expresión similar en los tres grados.

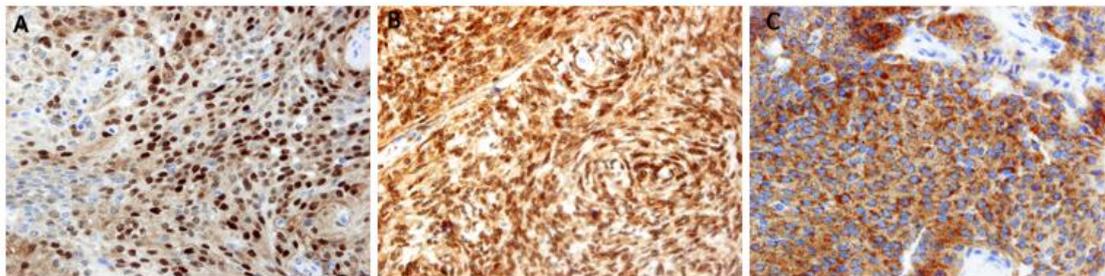


Figura 9. Validación de genes seleccionados de la firma molecular de meningiomas mediante tinción inmunohistoquímica. Meningiomas con expresión positiva de *CCND1*, tinción nuclear (A), *HES7*, tinción citoplasmática y nuclear (B) y *CDH1*, tinción citoplasmática (C).

		Gr I	Gr II	Gr III	Totales
CCND1	Positivos	86,7% (59/68)	92% (23/25)	100% (3/3)	88,5% (85/96)
	Negativos	13,3% (9/68)	8% (2/25)	0% (0/3)	11,5% (11/96)
HES7	Positivos	90% (54/60)	95,6% (22/23)	100% (3/3)	91,8% (79/86)
	Negativos	10% (6/60)	4,3% (1/23)	0% (0/3)	8,2% (7/86)
CDH1	Positivos	64,8% (46/71)	65,4% (17/26)	66,7% (2/3)	65% (65/100)
	Negativos	35,2% (25/71)	34,6% (9/26)	33,3% (1/3)	35% (35/100)

Tabla 11. Resultados de inmunohistoquímica. Gr I, Gr II y Gr III: grados I, II y III de la OMS, respectivamente. Se muestran los porcentajes de expresión y entre paréntesis el número de muestras con expresión positiva o negativa de los casos analizados para cada marcador.

3. Perfil de expresión génica y de microRNAs asociado a recidiva de meningioma

3.1. Perfil de expresión génica de recidivas

Para identificar el perfil de expresión génica característico de la recidiva tumoral, se intentó realizar la comparación de muestras recogidas en el diagnóstico con la correspondiente recidiva procedente del mismo paciente. Sin embargo, al no disponer de tejido congelado de estas muestras pareadas, comparamos el perfil de expresión de las muestras recogidas al diagnóstico de tumores originales que recidivaron posteriormente, con muestras recogidas en el momento de la recidiva, a pesar de que no procedían de los mismos pacientes. Los análisis estadísticos no identificaron genes diferencialmente expresados (GDEs), por lo que los perfiles de expresión de las muestras originales que recidivaron posteriormente y las muestras de las recidivas tumorales, son muy similares. Aunque las muestras incluidas en el análisis estadístico son pocas, estos resultados sugieren que no hay diferencias a nivel de expresión génica entre la muestra al diagnóstico de tumores que recidivan posteriormente y la propia recidiva.

Con el propósito de buscar diferencias en la expresión génica entre meningiomas originales que no recidivaron y meningiomas recurrentes se compararon 33 meningiomas originales (muestra en el momento de diagnóstico) y 7 recidivas (muestras en la recidiva), todas correspondientes a grados I y II de la OMS. Se excluyeron por tanto, los tumores de grado III, para evitar la identificación de genes asociados a recidiva dependientes del grado de malignidad, y debido a que los meningiomas de grado III presentan patrones de expresión muy diferentes de los grados I y II (74, 75).

El análisis estadístico (test de *Student*) identificó 425 genes y ESTs diferencialmente expresados entre meningiomas originales y recurrentes (FDR < 0,20). Entre estos genes diferencialmente expresados (GDEs), el 81,9% (104/127) estaban reprimidos y el 18,1% (23/127) estaban sobreexpresados en recidivas, con niveles de expresión de más de dos veces por encima o por debajo de los niveles de expresión del tejido normal. En la Tabla 12 se muestran los genes más diferencialmente expresados, ordenados por localizaciones cromosómicas de interés en meningioma.

Símbolo	Descripción	R vs. O*	R**	O**
1p				
<i>PPAP2B</i>	Fosfatasa de ácido fosfatídico tipo 2b	-3,6	-3	-1
<i>LMO4</i>	Dominio LIM4	-3,6	n	1,8
<i>CYR61</i>	Inductor angiogénico rico en cisteína 61	-3	-2	n
<i>EXTL2</i>	Gen de exostosis tipo 2	-2,5	n	0,9
<i>F3</i>	Factor de coagulación 3	-2,5	-1	0,6
<i>DDAH1</i>	Dimetilarginina dimetilaminohidrolasa 1	-2,5	-1	n
<i>PGM1</i>	Fosfoglucomutasa1	-2,4	-1	n
<i>DNAJB4</i>	Homólogo DnaJ (Hsp40), subfamilia B, miembro 4	-2,4	-1	n
<i>DHRS3</i>	Deshidrogenasa/Reductasa miembro 3 (familia SDR)	-2,3	-1	n
<i>BCAR3</i>	Gen de resistencia antiestrógenos del cáncer de mama 3	-2,3	-1	n
<i>TMEM50A</i>	Proteína transmembrana 50B	-2,3	-2	n
<i>TGFBR3</i>	Receptor 3 del factor de crecimiento beta	-2,1	-2	-1
<i>PNRC2</i>	Receptor del coactivador nuclear rico en prolina 2	-2,1	-1	n
<i>CMPK</i>	Citidilato quinasa	-2	-1	n
<i>MKMK1</i>	MAP quinasa de unión a serin-treonin quinasa 1	-2	-1	n
<i>DPYD</i>	Deshidrogenasa dihidropirimidina	-2	-2	-1
<i>MAN1C1</i>	Miembro 1, clase 1C, alfa-manosidasa	-2	-1	n
<i>LPHN2</i>	Latrofilina 2	-1,9	-2	n
<i>SFRS4</i>	Factor de <i>splicing</i> , rico en arginina/serina 4	-1,9	-2	-1
<i>RPS8</i>	Proteína ribosomal S8	-1,9	-1	n
<i>IPP</i>	Partícula polipeptídica intracisternal A	-1,8	n	0,6
<i>HMGN2</i>	Alta movilidad de grupos de dominio nucleosomal vinculante 2	-1,8	-2	-1
<i>GSTM1</i>	Glutation S-transferasa M1	-1,8	n	0,6
<i>GADD45A</i>	Proteína de detención de crecimiento inducida por daño en ADN	-1,8	-1	n
<i>CYP4X1</i>	Polipéptido 1 de citocromo P450, familia 4, subfamilia X	2,4	0,8	2,1
6p				
<i>HIST1H1C</i>	Cluster de histonas 1, H1c	5,1	2,1	n
<i>PRPH2</i>	Periferina 2	3,2	n	1,7
<i>HIST1H1E</i>	Cluster de histonas 1, H1e	3	1,2	n
<i>HIST1H1D</i>	Cluster de histonas 1, H1d	2,5	1,5	n
<i>HIST1H2AD</i>	Cluster de histonas 1, H2ad	2,2	n	-1
<i>HIST1H2BH</i>	Cluster de histonas 1, H2bh	2,2	1,1	n
<i>HIST1H2BO</i>	Cluster de histonas 1, H2bo	2,1	1,1	n
<i>HIST1H2BN</i>	Cluster de histonas 1, H2bn	2	1	n
<i>HIST1H2BF</i>	Cluster de histonas 1, H2bf	2	1	n
<i>HIST1H2AE</i>	Cluster de histonas 1, H2ae	2	n	-1
<i>HIST1H2BI</i>	Cluster de histonas 1, H2bi	2	0,9	n
<i>HIST1H2BL</i>	Cluster de histonas 1, H2bl	2	1	n
<i>HIST1H2BC</i>	Cluster de histonas 1, H2bc	1,9	1,3	n
<i>HIST1H2BE</i>	Cluster de histonas 1, H2be	1,9	0,8	n
<i>HIST1H2BG</i>	Cluster de histonas 1, H2bg	1,8	1,2	n
<i>HIST1H2BD</i>	Cluster de histonas 1, H2bd	1,8	1,5	0,7
<i>HIST1H2BM</i>	Cluster de histonas 1, H2bm	1,8	1	n
<i>GMDS</i>	GDP-manose 4,6-deshidratasa	-1,9	n	0,9
<i>RAB23</i>	Miembro RAS23 de la familia de oncogenes RAS	-2,2	n	0,9
<i>HSPA1A</i>	Proteína de choque térmico de 70 kDa 1A	-2,8	-1	n

Símbolo	Descripción	R vs. O*	R**	O**
6q				
<i>CTGF</i>	Factor de crecimiento de tejido conectivo	-5,5	-2	n
<i>PRSS35</i>	Serín proteasa 35	-3,6	n	1,8
<i>MAP3K5</i>	Proteína quinasa quinasa quinasa activada por mitógeno 5	-2,6	-2	-1
<i>RNF146</i>	Anillo de proteínas de dedo 146	-2,4	-2	n
<i>EPB41L2</i>	Banda 4.1 de membrana de eritrocito tipo 2	-2,3	-1	n
<i>PNRC1</i>	Receptor del coactivador nuclear rico en prolina 1	-2,2	-1	n
<i>SERINC1</i>	Incorporador de serina 1	-2,2	-2	-1
<i>AKAP7</i>	Proteína de anclaje a quinasa 7	-2,1	-2	n
<i>SESN1</i>	Sestrina 1	-2,1	-2	n
<i>CNKSR3</i>	Miembro 3 de la familia CNKSR	-1,9	-1	n
<i>SNX3</i>	Nexina3	-1,9	-2	-1
<i>TSPYL4</i>	TSPY tipo 4	-1,9	-1	n
<i>FOXO3A</i>	Caja <i>forkhead</i> O3A	-1,9	n	0,6
<i>CD164</i>	Molécula CD164, sialomucina	-1,9	-1	n
<i>DLL1</i>	Delta-tipo 1 (<i>Drosophila</i>)	-1,8	-2	-2
<i>ME1</i>	Enzima málico 1, NADP(+)-dependiente, citosólica	-1,8	n	0,6
<i>CCDC28A</i>	Dominio de bobina en espiral 28A	-1,8	-1	n
14q				
<i>TMEM30B</i>	Proteína transmembrana 30B	-5,8	-2	n
<i>SMOC1</i>	Módulo SPARC de unión al calcio 1	-3	-1	1
<i>LTBP2</i>	Proteína de unión al factor de crecimiento latente beta 2	-2,9	-2	n
<i>KLHDC2</i>	Dominio kelch 2	-2,1	-1	n
<i>SIPA1L1</i>	Proteína de proliferación1 inducida por señal tipo 1	-1,9	-1	n
<i>PRKCH</i>	Proteína quinasa C	-1,8	-2	-1
<i>TRMT5</i>	Homólogo TRM5 tRNA metiltransferasa 5 (<i>S. cerevisiae</i>)	-1,8	-2	-1
<i>ALDH6A1</i>	Miembro A1 de la familia de aldehído deshidrogenasa 6	2,2	n	1,2
Otras localizaciones cromosómicas				
<i>SFRP1</i>	Proteína secretada asociada a <i>frizzled</i> 1 (8p)	-6,1	-2,4	n
<i>SERPINF1</i>	Inhibidor de serpin peptidasas 1F (17p)	-4,4	-3	-1
<i>UCHL1</i>	Ubiquitin-estearasa carboxi terminal L1 (4p)	-4	-1,9	n
<i>SFRP4</i>	Proteína secretada asociada a <i>frizzled</i> 4 (7p)	-3,4	-1	1
<i>CDKN2A</i>	Inhibidor de quinastas dependiente de ciclina 2a (9p)	2,45	1,7	n

Tabla 12. Genes diferencialmente expresados entre meningiomas originales y recidivas agrupados por localización cromosómica. *: Diferencias de expresión entre meningiomas recurrentes (R) y originales (O). **: Valores medios de expresión de recidivas (R) y originales (O) normalizados frente a tejido meningotelial no tumoral (\log_2). Los valores positivos y negativos indican niveles de expresión altos y bajos, respectivamente, en recidivas frente a originales; n: datos de expresión similares a los del tejido normal.

3.2. Rutas moleculares asociadas a la recidiva del tumor

Para identificar las rutas moleculares implicadas en la recidiva de los meningiomas llevamos a cabo un análisis con el programa GSEA. Este análisis identificó 21 rutas alteradas, significativamente ($FDR < 0,15$), en recidivas. Tres de estas rutas aparecían sobreexpresadas y 18 reprimidas en tumores recurrentes en comparación con originales (Figura 10).

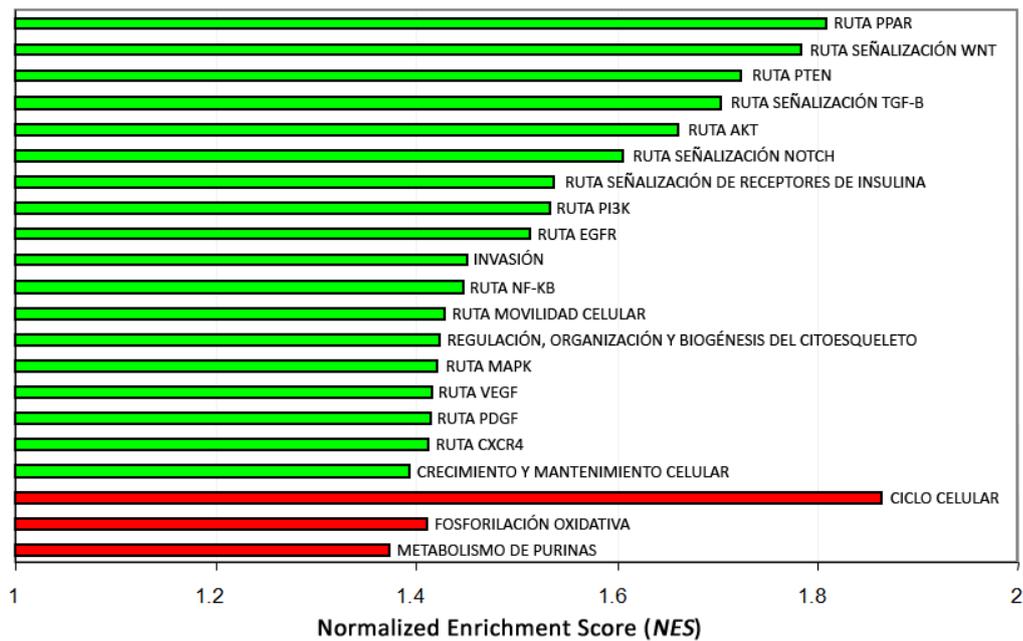


Figura 10. Rutas moleculares alteradas asociadas a meningiomas recurrentes, ordenadas por el *Normalized Enrichment Score (NES)*. Rutas moleculares reprimidas y sobreexpresadas en recidivas en color verde y rojo, respectivamente.

Los tres genes más diferencialmente expresados entre recidivas y originales están relacionados con la ruta de señalización WNT (wingless) (*SFRP1*), ciclo celular (*TMEM30B*) y angiogénesis (*CTGF*).

3.3. Perfil de microRNAs asociado a la recidiva tumoral

Se identificó un perfil de microRNAs compuesto por un total de 37 microRNAs alterados en recidivas al comparar con meningiomas originales ($FDR \leq 0,5$). De ellos, 10 y 26 microRNAs mostraron una expresión de 1,5 veces por debajo o por encima de los niveles de expresión de meningiomas originales, respectivamente. Es decir, que el 70%

(26/37) de microRNAs asociados a recidiva tumoral estaban sobreexpresados al comparar con meningiomas originales.

Se asoció el perfil de microRNAs con el perfil de expresión génica, mediante la búsqueda de las dianas génicas de estos microRNAs en varias bases de datos y seleccionando aquellas dianas comunes en al menos dos de ellas, para obtener así dianas más fiables. Se relacionaron los genes regulados por estos microRNAs con los genes diferencialmente expresados en recidiva, encontrándose que el 16,5% (70/425) de los GDEs asociados a recidiva estaban regulados por 19 microRNAs (5 reprimidos y 14 sobreexpresados). Por otra parte, la mayoría de los genes regulados por los 14 microRNAs sobreexpresados (90,5%, 48/53) se encontraban reprimidos en las recidivas tumorales (Tabla 13).

<i>microRNAs reprimidos</i>	Genes asociados a recidiva regulados por microRNAs
hsa-miR-586	<i>BNC2</i> ●, <i>EIF5A2</i> ●, <i>PHLDA1</i> , <i>PLCB1</i> , <i>ZBTB34</i> ●
hsa-miR-1909	<i>TMEM132A</i> ●
hsa-miR-130b	<i>AKAP7</i> , <i>ATXN1</i> ●, <i>DLL1</i> , <i>EIF2C1</i> ●, <i>SASH1</i> , <i>TMEM9B</i> ●, <i>WDR20</i>
hsa-miR-224*	<i>CORO1C</i> , <i>CTNNBIP1</i> ●, <i>DR1</i> , <i>IGF2R</i> , <i>KIF23</i> , <i>PPAP2B</i> , <i>TMEM9B</i> ●, <i>WTAP</i>
hsa-miR-29b-2*	<i>AGPAT4</i> , <i>CMPK</i> , <i>CORO6</i> ●, <i>EIF2C1</i> ●, <i>SLC30A3</i> , <i>TMEM132A</i> ●
<i>microRNAs sobreexpresados</i>	
hsa-miR-32*	<i>AHCYL1</i> , <i>ATXN1</i> ●, <i>C20orf39</i> , <i>CTNNBIP1</i> ●, <i>FBXO33</i> , <i>FLI1</i> , <i>GPBP1L1</i> , <i>PITPNA</i> , <i>RAB23</i> , <i>SLC12A2</i> , <i>SMAD7</i> , <i>ZBTB34</i> ●
hsa-miR-574-5p	<i>CACNA2D2</i> ●
hsa-miR-559	<i>CCDC100</i> , <i>ME1</i> , <i>SERBP1</i> , <i>SLC23A2</i>
hsa-miR-545	<i>BHLHB3</i> ●, <i>BNC2</i> ●, <i>CUGBP2</i> , <i>MYLK</i> ●, <i>PIK3R1</i> ●, <i>REEP1</i>
hsa-miR-1973	<i>CORO6</i> ●, <i>PIK3R1</i> ●, <i>RBM9</i>
hsa-miR-513a-5p	<i>CREBL2</i> , <i>DDAH1</i> , <i>LPHN2</i> , <i>PRKCH</i> , <i>SERBP1</i> ●, <i>SFRP1</i> , <i>ZBTB34</i> ●
hsa-miR-1539	<i>IGF1</i>
hsa-miR-155*	<i>BNC2</i> ●, <i>FGF7</i> , <i>MYLK</i> ●
hsa-miR-658	<i>CDON</i>
miR-1205	<i>AMMECR1</i> , <i>BCL2L11</i> , <i>C20orf20</i> , <i>EIF2C1</i> ●, <i>FHL1</i> , <i>KCNMA1</i> , <i>KREMEN1</i> , <i>LBA1</i> , <i>MKNK1</i> , <i>TSHZ1</i>
hsa-miR-138	<i>ARHGEF3</i> , <i>BHLHB3</i> ●, <i>EIF2C1</i> ●
hsa-miR-222*	<i>ATXN1</i> ●, <i>EIF5A2</i> ●, <i>IRF2</i> , <i>MSL2L1</i>
hsa-miR-548a-3p	<i>ATXN1</i> ●, <i>GPC4</i> , <i>PDSS2</i> , <i>PIK3R1</i> ●, <i>SERBP1</i> ●, <i>TGFBR3</i>
hsa-miR-603	<i>CACNA2D2</i> ●, <i>KLHL3</i> , <i>MYLK</i> ●, <i>SERBP1</i> ●, <i>VAPA</i>

Tabla 13. Asociación entre microRNAs diferencialmente expresados entre meningiomas originales y recidivas y sus correspondiente dianas de la firma de recidivas. MicroRNAs reprimidos y sobreexpresados que regulan genes asociados a recidiva tumoral (en verde genes reprimidos y en rojo sobreexpresados). ●: Genes regulados por más de un microRNA.

3.4. Análisis de alteraciones cromosómicas en meningiomas recurrentes

3.4.1. Localización cromosómica de genes asociados a recidiva

El análisis de la localización cromosómica de GDEs entre tumores originales y recurrentes reveló que las localizaciones más frecuentes fueron 1p (18%), 6q (12,1%), 6p (8,3%), 14q (7,5%) y 1q (5,6%), (Figura 11A).

Las localizaciones de los GDEs se compararon con las localizaciones de todos los genes representados en el oligomicroarray. El porcentaje de GDEs localizados en los cromosomas 1p, 1q, 6p, 6q y 14q fue significativamente mayor que el porcentaje de todas las sondas del microarray analizadas en estas localizaciones ($P < 0,001$) (Figura 11B, Tabla 14).

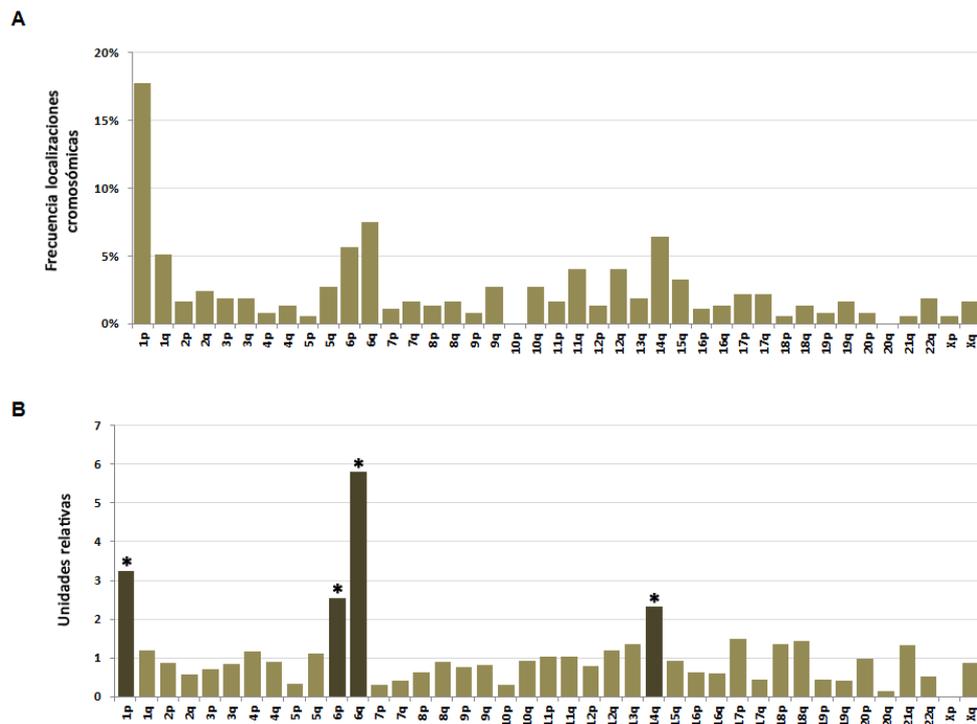


Figura 11. Localización cromosómica de genes asociados a recidiva. A: Diagrama de la frecuencia de localizaciones de genes diferencialmente expresados en meningiomas originales y recurrentes. **B:** Localizaciones de genes diferencialmente expresados (O vs. R) referidas a las localizaciones de los genes en el microarray. Las barras negras indican las localizaciones significativas más frecuentes tras la ponderación de las localizaciones en función del número de genes analizados en el microarray en cada brazo cromosómico. *: $P \leq 0,01$.

El análisis detallado de los niveles de expresión génica en las localizaciones cromosómicas más frecuentes reveló que la mayoría de genes localizados en 1p, (67/67), 6q (44/45) y 14q (28/28) estaban reprimidos en recidivas al comparar con meningiomas originales, mientras que la mayoría de genes localizados en 1q (16/21) y 6p (22/31) estaban sobreexpresados (Tabla 14).

Citobanda	Genes en microarray (%)	Genes diferencialmente expresados		
		Total (%)	O vs R ^ψ	
			Reprimidos en R	Sobreexpresados en R
1p**	750 (5,56)	67 (18,01)	67	0
6q**	281 (2,08)	45 (12,10)	44	1
6p**	444 (3,29)	31 (8,33)	9	22
14q**	438 (3,25)	28 (7,53)	28	0
1q*	635 (4,67)	21 (5,65)	5	16

Tabla 14. Porcentaje de genes del microarray y GDEs. O: meningiomas originales; R: recidivas. En esta tabla se muestran las comparaciones significativas con las localizaciones incluidas en el microarray. **: $P < 0.001$; *: $P < 0,05$. Ψ : Análisis realizados con 423 genes con localización conocida.

Posteriormente, se analizaron los niveles de expresión de los GDEs en recidivas con respecto al tejido normal para determinar la expresión global de estos genes en recidivas. Este análisis mostró una represión de los GDEs en recidivas, en 1p (79%, 53/67), 6q (80%, 36/45) y 14q (75%, 21/28). Por el contrario, los genes sobreexpresados con respecto al tejido normal, se encontraron en las regiones 1q (62%, 13/21) y 6p (61%, 19/31), (Figura 12).

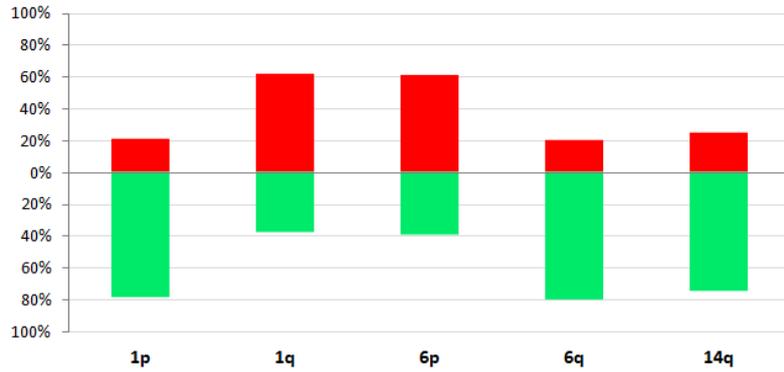


Figura 12. Porcentaje de GDEs asociados a recidiva localizados en los cromosomas 1p, 1q, 6p, 6q y 14q con niveles de expresión 0,5 veces por encima y por debajo, en rojo y verde, respectivamente, de los niveles de expresión del tejido normal.

Por otra parte, el análisis detallado de la localización de los GDEs entre meningiomas originales y recurrentes reveló una distribución homogénea a lo largo de los brazos de los cromosomas 1p, 1q, 6q y 14q. Sin embargo, prácticamente todos los genes localizados en el cromosoma 6p sobreexpresados, se concentraban en 6p22.1, localización del cluster de histonas 1 (Figura 13).

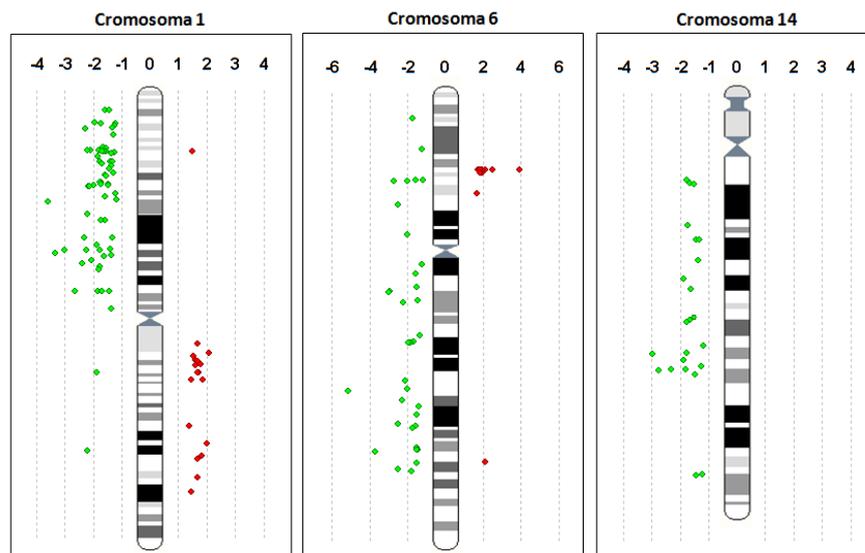


Figura 13. Distribución de los genes diferencialmente expresados en meningiomas originales y recurrentes, en los cromosomas 1, 6 y 14, representados de acuerdo a su posición en el mapa. Se representan los genes (puntos) con niveles de expresión en recidivas 1,5 veces por encima (rojo, derecha), y por debajo (verde, izquierda) de los niveles de expresión del tejido normal.

3.4.2. Análisis de la pérdida de 1p mediante FISH

Debido a que 1p fue la localización cromosómica más frecuente de los genes asociados a recidiva, y ya que todos los genes localizados en 1p tenían un nivel de expresión menor en recidivas al comparar con tumores originales, decidimos evaluar si la represión de genes localizados en 1p podría estar relacionada con la pérdida cromosómica de esta región. Este análisis se llevó a cabo mediante FISH, utilizando una sonda control localizada en 1q25 y una sonda problema localizada en 1p36. La Figura 14A muestra una célula sin pérdida de 1p (2 señales verdes y 2 rojas) y otra con pérdida (2 señales verdes y una roja).

De esta forma se observó pérdida del cromosoma 1p en cinco de siete recidivas (71,4%) y en todos los meningiomas originales que recidivaron posteriormente (6/6). Por el contrario, solo el 25,8% (16/62) de los meningiomas originales que no habían recidivado hasta la fecha mostraron pérdida de 1p (Figura 14B). Por otra parte se observó también que la pérdida de 1p se asociaba al grado tumoral, siendo más frecuente en meningiomas atípicos y anaplásicos que en benignos (Figura 14C).

Para determinar la posibilidad de que la pérdida de 1p se asocie con el tiempo de recidiva tumoral, se realizó el test de *log-rank* y curvas Kaplan-Meier. Se encontró una asociación, estadísticamente significativa ($P = 0,02$), entre la pérdida de 1p y el tiempo de recidiva tumoral de meningiomas (promedio de 50 meses de SLR) (Figura 14C).

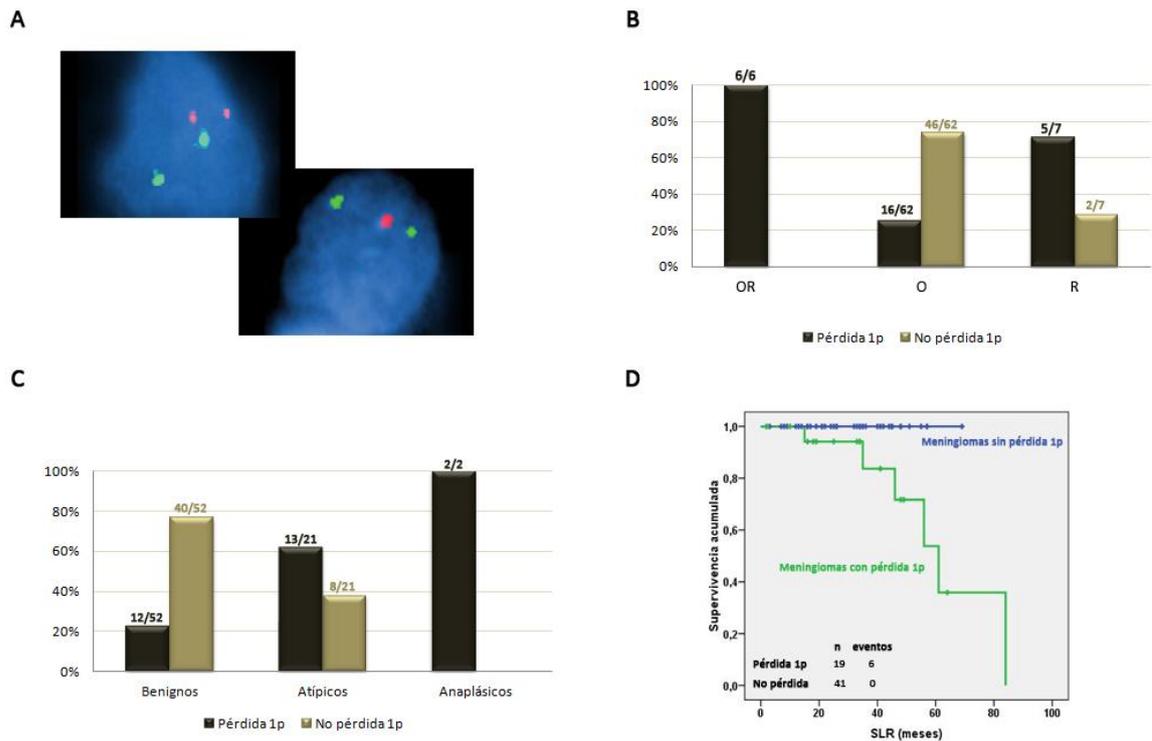


Figura 14. Análisis de la pérdida de 1p mediante FISH. A: Imágenes de una célula sin pérdida de 1p (derecha), y una célula con pérdida de 1p (izquierda). **B:** Frecuencia de la pérdida de 1p en meningiomas originales que recidivan (OR), meningiomas que no recidivan (O) y recidivas (R). **C:** Frecuencia de pérdida de 1p en grados I, II y III de la OMS. Los números sobre columnas indican el número de casos de cada grupo. **D:** Curvas Kaplan-Meier de supervivencia libre de recidiva (SLR) basadas en la pérdida de 1p (P -valor < 0,05).

4. Análisis del perfil de expresión común entre progresión y recidiva de meningioma

4.1. Perfil de expresión común asociado a progresión y recidiva

Se seleccionaron perfiles de expresión asociados a progresión que fueron identificados en trabajos que utilizaron microarrays (Tabla 6). Estos perfiles se compararon con el perfil de expresión asociado a recidivas de este estudio. Se obtuvo una firma compuesta por un total de 49 genes presentes en al menos uno de los perfiles asociados a progresión y en el de recidiva de meningiomas. La lista completa se muestra en la Tabla 15. Los patrones de sobreexpresión o represión encontrados en los genes comunes entre progresión y recidiva coincidían, a excepción de un gen, con

los genes asociados a recidiva y alto grado: el 71,4% (35/49) y 26,5% (13/49) de los genes comunes estaban reprimidos o sobreexpresados, respectivamente, tanto en meningiomas recurrentes como en los de alto grado.

Símbolo	Descripción	Localización cromosómica	Expresión media
<i>BCAR3</i>	Gen de resistencia antiestrógenos del cáncer de mama 3	1p22.1	R
<i>LMO4</i>	Dominio LIM4	1p22.3	R
<i>CYR61</i>	Inductor angiogénico rico en cisteína 61	1p22.3	R
<i>GADD45A*</i>	Proteína de detención de crecimiento inducida por daño en ADN	1p31.3	R*
<i>PPAP2B</i>	Fosfatasa de ácido fosfatídico tipo 2b	1p32.2	R
<i>MAN1C1</i>	Miembro 1, clase 1C, alfa-manosidasa	1p36.11	R
<i>CD200</i>	Molécula CD200	3q13.2	R
<i>MYLK</i>	Cadena ligera quinasa de la miosina	3q21.1	R
<i>UCHL1</i>	Estearasa ubiquitina carboxi-terminal L1	4p13	R
<i>CTXN3</i>	Cortexina 3	5q23.2	R
<i>C6orf117</i>	Marco abierto de lectura 117 del cromosoma 6	6q14.3	R
<i>FOXO3A</i>	Caja forkhead O3A	6q21	R
<i>DLL1</i>	Delta-tipo 1 (<i>Drosophila</i>)	6q27	R
<i>SFRP4</i>	Proteína secretada <i>frizzled 4</i>	7p14.1	R
<i>AUTS2</i>	Candidato de susceptibilidad al autismo 2	7q11.22	R
<i>SFRP1</i>	Proteína secretada asociada a <i>frizzled 1</i>	8p11.21	R
<i>PENK</i>	Proencefalina	8q12.1	R
<i>SVEP1</i>	Factor von Willebrand tipo A	9q31.3	R
<i>TNC</i>	Tenascina C	9q33.1	R
<i>SLC16A9</i>	Miembro 9 de la familia transportadora de solutos 16	10q21.1	R
<i>KCNMA1</i>	Canal de conductancia de potasio activo por calcio	10q22.3	R
<i>FOLR1</i>	Receptor del folato 1	11q13.4	R
<i>PDGFD</i>	Factor de crecimiento derivado de plaquetas D	11q22.3	R
<i>CDON</i>	Homólogo Cdon (ratón)	11q24.2	R
<i>SSPN</i>	Sarcospan (gen asociado al oncogen Kras)	12p12.1	R
<i>IGF1</i>	Factor de crecimiento tipo insulina 1 (somatomedina C)	12q23.2	R
<i>TMEM30B</i>	Proteína transmembrana 30B	14q23.1	R
<i>LTBP2</i>	Proteína de unión al factor de crecimiento latente beta 2	14q24.3	R
<i>FGF7</i>	Factor de crecimiento de fibroblastos 7	15q21.1	R
<i>CALML4</i>	Calmodulina 4	15q23	R
<i>SERPINF1</i>	Miembro 1, inhibidor serpin peptidasa, clase F	17p13.3	R
<i>CORO6</i>	Coronina 6	17q11.2	R
<i>MYO5B</i>	Miosina VB	18q21.1	R
<i>TIMP3</i>	Inhibidor de metalopeptidasa 3	22q12.3	R
<i>TCEAL2</i>	Factor elongación de transcripción tipo 2	Xq22.1	R
<i>FHL1</i>	Proteína de músculo esquelético LIM1	Xq26.3	R
<i>TNNT2</i>	Troponina T tipo 2 (cardiaca)	1q32.1	S
<i>RRM2</i>	Polipéptido M2 de ribonucleótido reductasa	2p25.1	S
<i>PTTG2</i>	Proteína transformante de tumor de pituitaria2	4p14	S
<i>HIST1H2BD</i>	Cluster de histonas 1, H2bd	6p22.1	S
<i>HIST1H2BI</i>	Cluster de histonas 1, H2bi	6p22.1	S
<i>HIST1H1C</i>	Cluster de histonas 1, H1c	6p22.1	S
<i>CKS2</i>	Subunidad reguladora 2 de la quinasa CDC28	9q22.2	S
<i>CEP55</i>	Proteína centrosómica 55kDa	10q23.33	S
<i>PHLDA1</i>	Miembro 1 dominio tipo homólogo de plecstrina, familia A	12q21.2	S

Símbolo	Descripción	Localización cromosómica	Expresión media
<i>KIF23</i>	Miembro 23 de la familia de la quinesina	15q23	S
<i>VTN</i>	Vitronectina	17q11.2	S
<i>TK1</i>	Timidina quinasa soluble 1	17q25.3	S
<i>COL18A1</i>	Colágeno, tipo XVIII, alfa 1	21q22.3	S

Tabla 15. Firma de los 49 genes diferencialmente expresados asociados a progresión y recidiva de meningiomas. Genes de progresión y recidiva ordenados por expresión media. Se muestra la localización cromosómica. R: reprimidos y S: sobreexpresados, tanto en tumores de alto grado como en recidiva. *: Gen sobreexpresado en estudios de progresión y reprimido en el perfil asociado a recidiva.

Para determinar la capacidad de clasificación de estos 49 genes asociados a progresión y recidiva, se llevó a cabo una agrupación jerárquica de las 44 muestras analizadas utilizando los valores de expresión génica correspondientes a los 49 genes. Este análisis clasificó los tumores en dos grupos (Figura 15A). Uno de ellos (grupo A), más agresivo, estaba compuesto por todos los meningiomas anaplásicos (4/4), la mayoría de meningiomas atípicos (12/17) y 3 meningiomas benignos (3/23). De forma notable, casi todos los pacientes recurrentes, es decir, muestras que recidivaron posteriormente o recidivas (11/12) se encontraban en este grupo. El otro grupo (B), menos agresivo, estaba compuesto por la mayoría de meningiomas benignos (20/23) y solo 5 meningiomas atípicos. Estos 5 meningiomas atípicos presentaron índices de proliferación, medidos con el anticuerpo MIB-1, bajos o solo focalmente positivos. Es interesante resaltar que 3 de estos meningiomas atípicos presentaban una morfología cordoide, y por tanto se consideraron grado II de malignidad según la OMS.

Por otra parte, el análisis de SLR basado en estos dos grupos definidos por el conjunto de los 49 genes, mostró que el grupo A, más agresivo, estaba asociado con una menor SLR (Figura 15B). Es interesante mencionar que el seguimiento y el tiempo libre de recidiva medios de los pacientes incluidos en el análisis de expresión fueron de 6,1 y 3,4 años, respectivamente.

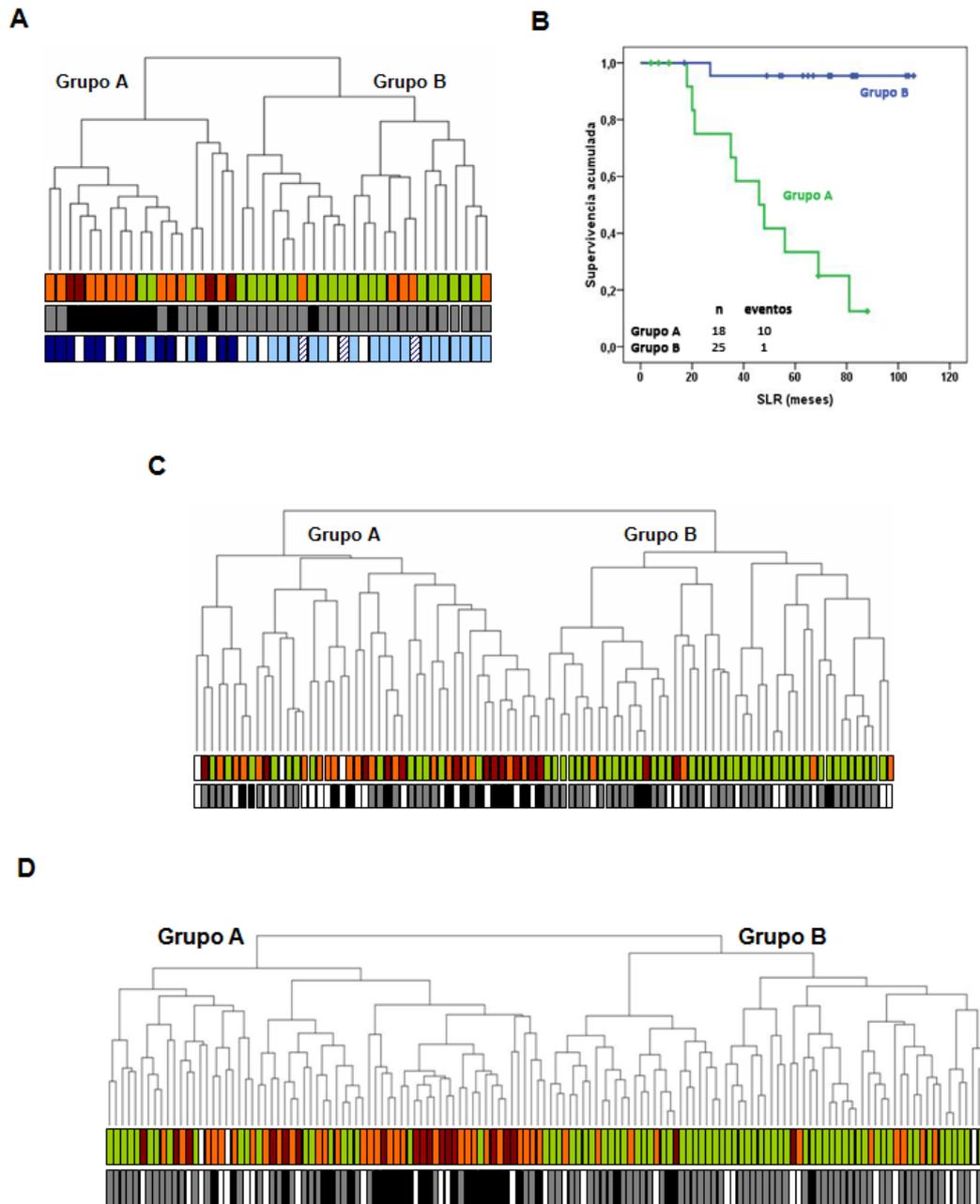


Figura 15. A: Agrupación de las muestras basada en los 49 genes asociados a progresión y recidiva usando datos de expresión asociados a recidiva; **B:** Curvas de Kaplan-Meier basadas en la supervivencia libre de recidiva (SLR) determinadas por los grupos obtenidos en el análisis de *clustering* (grupos A y B, verde y azul, respectivamente) ($P < 0.05$). **C:** dendrograma con 92 muestras procedentes de los estudios de Keller y col. GSE12530, (74), y de Lee y col. GSE16584, (70). **D:** dendrograma con las 136 muestras procedentes de los 3 estudios. Meningiomas benignos, atípicos y anaplásicos se muestran en verde, naranja y granate, respectivamente. Meningiomas recurrentes y no recurrentes en negro y gris, respectivamente. Los índices de proliferación altos y bajos se muestran en azul oscuro y claro, respectivamente, mientras que muestras con MIB-1 focalmente alto se muestran con rayas azules. En blanco, muestras sin información clínica.

Además, para validar la utilidad de los 49 genes asociados a progresión y recidiva, se recogieron datos de expresión adicionales de la base de datos *Gene Expression Omnibus (GEO)* (GSE12530 y GSE16584; (70, 74)) procedentes de 92 muestras de meningiomas. El *cluster* jerárquico utilizando los 49 genes asociados a progresión y recidiva con estos datos clasificó los tumores en dos grupos: uno más agresivo, que incluía la mayoría de meningiomas atípicos y anaplásicos, incluyendo muestras que recidivaron posteriormente y recidivas; y otro grupo menos agresivo compuesto en su mayor parte por meningiomas benignos (Figura 15C). Asimismo, se llevó a cabo un *cluster* con el total de 136 muestras procedentes de este (44 muestras) y otros estudios (92 muestras) (70, 74), e igualmente se observaron dos grupos (Figura 15D).

5. Validación de la expresión de los genes asociados a recidiva y progresión

Se han seleccionado 8 genes para validar su expresión génica mediante qRT-PCR: *TMEM30B*, *CTGF*, *UCHL1*, *SFRP1*, *LTBP2*, *TGFBR3*, *SFRP4* y *SERPINF1*. Otros 3 genes se validaron mediante técnicas inmunohistoquímicas: *HIST1H1C*, *CKS2* y *LMO4*. Estos genes se han seleccionado bien por su localización cromosómica, bien por su implicación en rutas y funciones asociadas a cáncer.

Además, se han seleccionado siete microRNAs para validar su expresión mediante qRT-PCR: miR-545, 513a-5p, miR-370, miR-654, miR-485-5p, miR-200a y miR-30a-5p. Estos microRNAs se seleccionaron debido a que regulan posibles dianas de gran interés en meningiomas y por estar localizados en cromosomas cuya pérdida se ha asociado a meningiomas y recidiva (Tabla 16).

microRNA	Localización cromosómica	Dianas que regulan
miR-200a	1p	<i>CTNNA1</i> , <i>TGFB2</i>
miR-30a-5p	6q	<i>BCL2</i> , <i>SMAD2</i>
miR-370	14q	<i>CDKN1A</i>
miR-654	14q	<i>PIK3R3</i>
miR-485-5p	14q	<i>ATP6V1C2</i> , <i>DVL3</i> , <i>TCF7</i> , <i>SORBS1</i>
miR-545	Xq	<i>BHLHB3</i> , <i>PIK3R1</i>
miR-513a-5p	Xq	<i>SFRP1</i> , <i>ZBTB34</i>

Tabla 16. MicroRNAs seleccionados para su validación. En la tabla se muestran la localización cromosómica y las dianas génicas que regulan.

5.1. Validación de la expresión génica y de microRNAs mediante análisis de qRT-PCR

Estos análisis confirmaron los niveles de expresión génica obtenidos mediante los estudios de microarrays para los genes y microRNAs: *TMEM30B*, *CTGF*, *SFRP1*, *LTBP2*, miR-200a, miR-485-5p y miR-370. Los genes analizados y los microRNAs miR-200a, miR-370 y miR-654 se encontraban reprimidos en recidivas frente a meningiomas originales, mientras que miR-545, miR-513a-5p, miR485-5p y miR-30a-5p se encontraban sobreexpresados. Estos análisis también confirmaron bajos niveles de expresión en meningiomas de alto grado para los genes: *TMEM30B*, *UCHL1*, *SFRP1* y *LTBP2*. Por otro lado, los datos de expresión de los genes *SFRP4* y *SERPINF1* obtenidos mediante qRT-PCR no confirmaron los datos de expresión de los microarrays (Tabla 17).

Gen/microRNA	Datos microarrays				Datos qRT-PCR			
	Alto vs. Bajo grado	FDR	Recidivas vs. Originales	FDR	Alto vs. Bajo grado	p-valor	Recidivas vs. Originales	p-valor
<i>TMEM30B</i>	-1,42	0,72	-5,78	0,07	-1,57	0,02	-3,01	< 0,001
<i>CTGF</i>	-3,19	0,22	-5,48	0,006	-	-	-2,39	< 0,001
<i>TGFBR3</i>	-1,51	0,24	-2,10	0,01	-	-	-1,09	0,7
<i>SFRP1</i>	-4,94	0,17	-6,08	0,006	-2,1	0,01	-3,00	0,006
<i>UCHL1</i>	-2,26	0,16	-4,05	0,19	-2,07	0,005	-1,46	0,12
<i>LTBP2</i>	-1,46	0,36	-2,95	0,009	-1,54	0,04	-1,42	0,04
<i>SFRP4</i>	-3,63	0,2	-3,40	0,12	-1,24	0,29	1,64	0,16
<i>SERPINF1</i>	-2,26	0,23	-4,46	0,02	-1,86	0,06	0,48	0,61
miR-545	-	-	1,51	0,31	-	-	1,23	< 0,001
miR-513a-5p	-	-	2,19	0,28	-	-	1,31	< 0,001
miR-200a	-	-	-1,09	0,91	-	-	-1,22	< 0,001
miR-485-5p	-	-	1,05	0,96	-	-	-1,28	0,02
miR-370	-	-	-1,39	0,68	-	-	-1,36	0,04
miR-654	-	-	-1,22	0,79	-	-	-0,80	0,26
miR-30a-5p	-	-	1,23	0,79	-	-	-0,44	0,39

Tabla 17. Niveles de expresión de microRNAs entre meningiomas de alto y bajo grado y entre recidivas y originales calculados mediante microarrays y qRT-PCR. La significación estadística se estableció con los valores *FDR* y *p-valor*, los valores significativos aparecen en negrita.

5.2. Análisis de la expresión proteica mediante técnicas inmunohistoquímicas

Los resultados inmunohistoquímicos de los marcadores HIST1H1C, CKS2 y LMO4 revelaron tinción nuclear en los 3 casos (Figura 16). En concordancia con los resultados obtenidos mediante el análisis de expresión génica con microarrays, los análisis de la expresión proteica mostraron que la expresión de CKS2 era más frecuente en recidivas y en meningiomas de alto grado al comparar con originales y de bajo grado, respectivamente. Estos resultados, también mostraron que la expresión de LMO4 era más frecuente en originales y en bajo grado que en recidivas y alto grado, respectivamente. Por otro lado, la expresión de HIST1H1C era más frecuente en recidivas que en originales, sin embargo en meningiomas de bajo y alto grado era similar (Figuras 16 y 17).

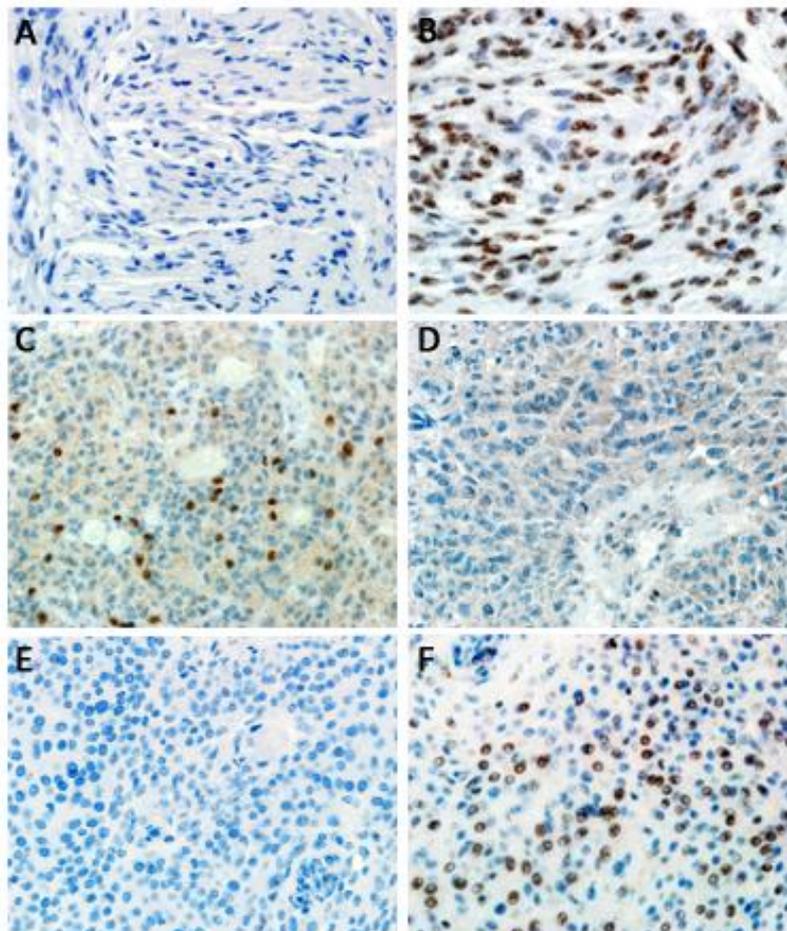


Figura 16. Meningiomas con expresión negativa **A**, y positiva **B**, de CKS2; meningiomas con expresión positiva **C**, y negativa **D** de LMO4; y meningiomas con expresión negativa **E**, y positiva **F**, de HIST1H1C (aumento original x400).

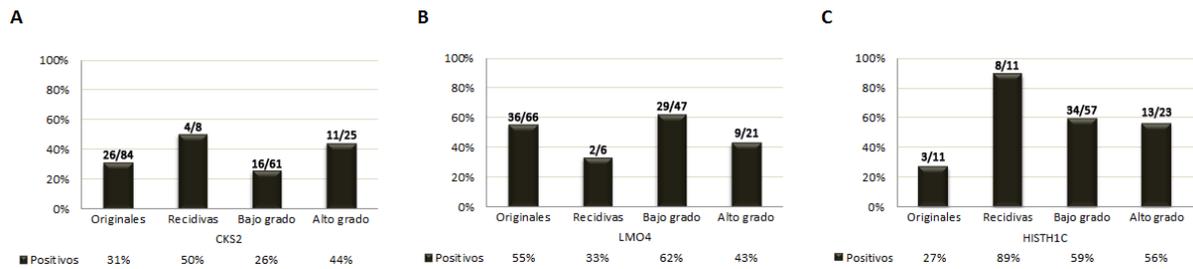


Figura 17. Porcentajes de expresión inmunohistoquímica. A: CKS2; B: LMO4; y C: HIST1H1C expresión positiva en meningiomas que no han recidivado (originales), recidivas, y en meningiomas de bajo y alto grado. Los números sobre las columnas indican el número de casos con expresión positiva para cada marcador.

5.3. Análisis de la supervivencia libre de recidiva basada en la expresión de **CKS2**

El gen *CKS2* fue el gen más consistentemente sobreexpresado entre todos los estudios de expresión génica analizados mediante microarrays, observándose una mayor y más frecuente expresión en meningiomas de alto grado y recurrentes. Para determinar la posibilidad de que la elevada expresión de *CKS2* se asocie con el tiempo de recidiva tumoral, se realizó el test de *log-rank* y curvas Kaplan-Meier, utilizando los datos de expresión del trabajo de Lee y colaboradores (70) y dividiendo los pacientes en dos grupos de acuerdo a la expresión media del ARNm de *CKS2* (185,8) en alta y baja expresión. Encontramos una asociación, estadísticamente significativa ($P < 0,05$), entre una expresión elevada de *CKS2* y el tiempo de recidiva tumoral de meningiomas (Figura 18).

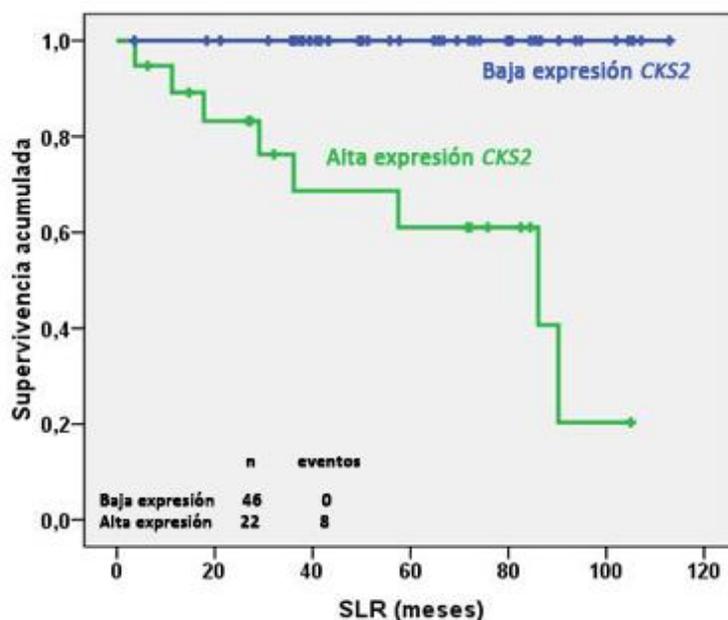


Figura 18. Curvas Kaplan-Meier de supervivencia libre de recidiva basadas en la expresión de *CKS2*. Las curvas indican la alta ($\geq 185,5$, verde) o baja ($< 185,8$, azul) expresión de *CKS2*, utilizando los datos de expresión de Lee y col. (70) ($P < 0,05$; riesgo: 1,01; Intervalo confianza 95%: 1-1,02).

5.4. Análisis de metilación de *UCL1* y *SFRP1*

Se estudió el estado de metilación de la región promotora del gen *UCL1* (*ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1*) (isla CpG 123, Figura 19A) como mecanismo de regulación de la expresión génica. La metilación fue detectada mediante MS-PCR en el 44,4% (16/36) de las muestras, presentando una mayor frecuencia de metilación en recidivas (66,7%, 4/6) al comparar con originales (34,6%, 9/26) (Figura 19B y 19C). Los resultados de MS-PCR fueron validados mediante secuenciación directa de las muestras tratadas con bisulfito de la isla CpG 123 que incluía 34 dinucleótidos CG de la región promotora del gen (Figura 19D). En conjunto, los análisis de expresión y de metilación revelaron que las muestras metiladas presentaron un descenso significativo en los niveles de expresión medios cuando se compararon con aquellas muestras de tumores no metiladas ($P < 0,05$) (Figura 19E). La figura 19F muestra un ejemplo de un fragmento de una secuencia metilada obtenida a partir de un clon de un meningioma recurrente.

Por otro lado, se analizó el estado de metilación de la región promotora del gen *SFRP1* (Figura 20A) detectándose hipermetilación del ADN mediante MS-PCR en el

22,6% de estas muestras (12/53) (Figura 20B). Se encontró un mayor porcentaje de tumores metilados en meningiomas de alto grado (37,5%, 6/16) y recidivas (50%, 4/8), mientras que en meningiomas originales y de bajo grado solo se encontró metilación en el 17,5% (7/40) y el 6,9% (2/29) de las muestras, respectivamente (Figura 20C). Dicha metilación fue confirmada mediante secuenciación directa de muestras representativas tratadas con bisulfito de la isla CpG 147 que contenía 49 dinucleótidos CG (Figura 20D). Tanto los análisis de expresión como de metilación, revelaron un descenso significativo en los niveles de expresión medios de *SFRP1* en tumores que presentaron metilación comparados con aquellos que no la mostraron ($P < 0,05$) (Figura 20E).

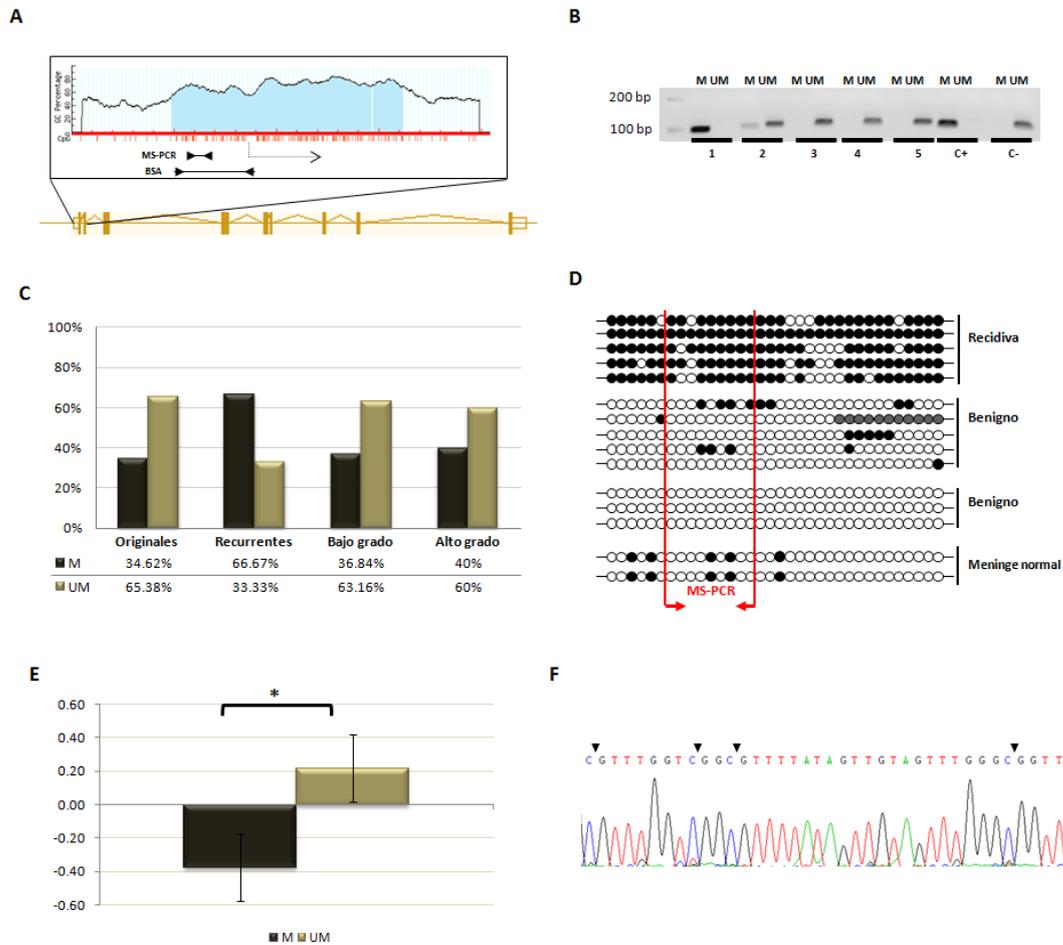


Figura 19. Análisis de metilación del gen *UCHL1*. **A:** Representación esquemática de la isla CpG analizada para *UCHL1*. La posición de los oligonucleótidos utilizados para la PCR específica de metilación o secuenciación del ADN después de la modificación con bisulfito se indican con puntas de flecha, así como el sitio de transcripción. **B:** MS-PCR de la isla CpG de *UCHL1* en distintos meningiomas; **1:** anaplásico; **2:** atípico; **3-5:** benignos; **C+:** ADN metilado *in vitro*; **C-:** muestra meningotelial no tumoral. **M:** metilación; **UM:** no metilación. **C:** Porcentaje de casos metilados (**M**) y no metilados (**UM**). **D:** Análisis de metilación tras modificación con bisulfito de un fragmento de la isla CpG en 3 muestras representativas y una meninge no tumoral. Citosinas metiladas en negro y no metiladas en blanco. **E:** Expresión génica media de *UCHL1* en muestras metiladas (**M**) y no metiladas (**UM**). **P* values < 0,05. **F:** Fragmento de una secuencia de la isla CpG del gen *UCHL1* en un meningioma recurrente. Los dinucleótidos CG metilados se indican con flechas.

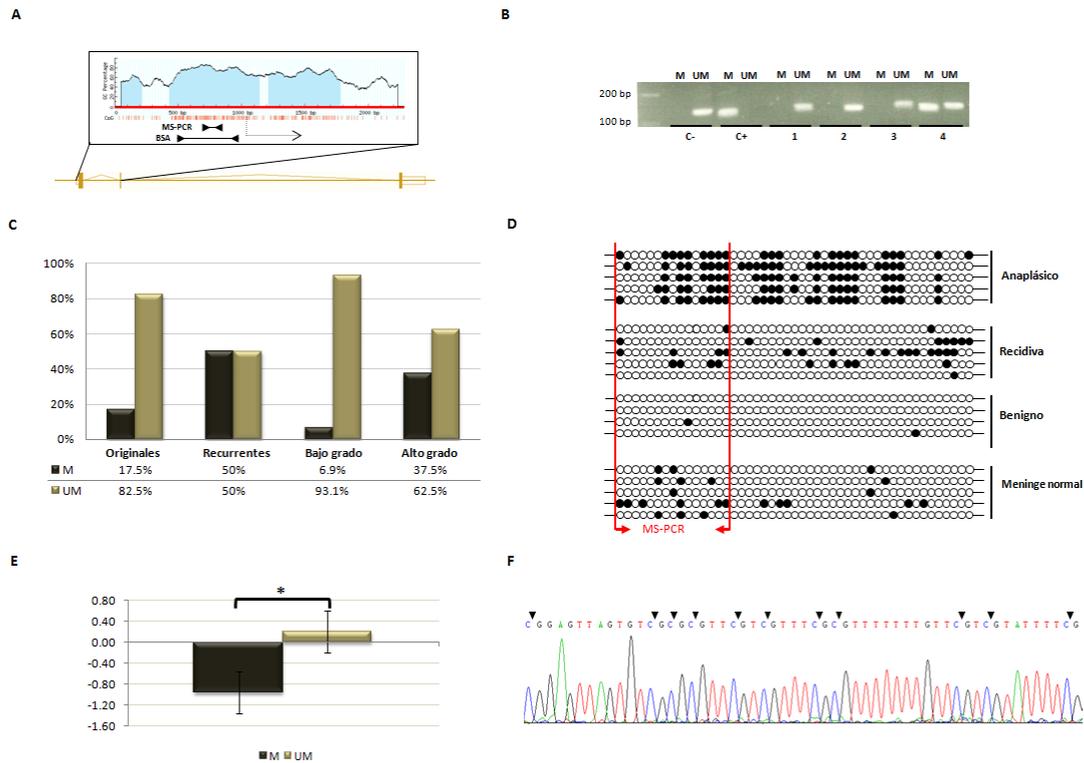


Figura 20. Análisis de metilación del gen *SFRP1*. **A:** Representación esquemática de la isla CpG analizada para *SFRP1*. La posición de los oligonucleótidos utilizados para la PCR específica de metilación o secuenciación del ADN después de la modificación con bisulfito se indican con puntas de flecha, así como el sitio de transcripción. **B:** MS-PCR de la isla CpG de *SFRP1* en distintos meningiomas; **1:** benigno; **2-3:** atípicos; **4:** anaplásico; **C+:** ADN metilado *in vitro*; **C-:** muestra meningotelial no tumoral. **M:** metilación; **UM:** no metilación. **C:** Porcentaje de casos metilados (**M**) y no metilados (**UM**). **D:** Análisis de metilación tras modificación con bisulfito de un fragmento de la isla CpG en 3 muestras representativas y una meninge no tumoral. Citosinas metiladas en negro y no metiladas en blanco. **E:** Expresión génica media de *SFRP1* en muestras metiladas (**M**) y no metiladas (**UM**). **P* values < 0,05. **F:** Fragmento de una secuencia de la isla CpG del gen *SFRP1* en un meningioma anaplásico. Los dinucleótidos CG metilados se indican con flechas.

Discusión

Los meningiomas son uno de los tumores más frecuentes del Sistema Nervioso Central, presentan una gran variedad de perfiles histológicos y están asociados con un amplio rango de características biológicas y comportamientos clínicos. El sistema de clasificación de la OMS ha mejorado a lo largo del tiempo, consiguiendo una mayor reproducibilidad y precisión diagnóstica y pronóstica. Sin embargo, sigue existiendo cierta subjetividad, especialmente para los meningiomas atípicos de grado II (11, 75). Además, la identificación de marcadores moleculares que ayuden al diagnóstico del grado tumoral, así como al manejo de los pacientes a nivel individual, sigue siendo necesaria.

Perfiles de expresión génica y de microRNAs en meningiomas

Se han comparado los perfiles de expresión génica y de microRNAs de los meningiomas con aquellos de tejido normal para identificar genes y microRNAs asociados al desarrollo y patogénesis de los meningiomas. Estos análisis han permitido identificar un perfil de expresión génica en meningiomas compuesto en su mayor parte por genes reprimidos (68,1%). De la misma manera, los resultados obtenidos también mostraron que la mayoría de las rutas significativamente alteradas en meningiomas se encontraban reprimidas. Estos resultados están en línea con los de otros autores que también han descrito alteraciones de las rutas identificadas en este trabajo, como las cascadas de complemento y coagulación, ruta de MAPK, ruta NOTCH o la ruta de señalización del TGF- β (74, 99, 100).

Igualmente, se ha definido un perfil de microRNAs específico de meningiomas, la mayoría de estos microRNAs estaban sobreexpresados (61%). Se llevó a cabo un estudio de las dianas génicas que regulan estos microRNAs y se observó que el 13,5% de los genes asociados a meningiomas se encontraban entre las dianas génicas reguladas por estos microRNAs y regulaban en gran parte genes reprimidos, por lo que podrían constituir un mecanismo alternativo de inactivación génica en meningiomas (101).

El perfil de expresión génica característico de los meningiomas incluía genes como el gen de la ciclina D1 (**CCND1**), que codifica para una proteína necesaria para la

progresión a través de la fase G1 del ciclo celular, lo que la convierte en una diana evidente durante el proceso neoplásico. Existen tres ciclinas de tipo D, casi indistinguibles desde el punto de vista bioquímico. Sin embargo, sólo la ciclina D1 se sobreexpresa con frecuencia en varios tipos de cáncer (102). La correlación entre la elevada expresión génica y los altos niveles de proteína encontrados en este estudio, junto con la observación de que este gen es diana del miR-302a, cuya sobreexpresión se ha identificado en este estudio, proporcionan una clara evidencia de que la ciclina D1 contribuye directamente a la tumorigénesis de los meningiomas, siendo un evento que aparece tanto en tumores benignos, como atípicos o anaplásicos.

Otro gen sobreexpresado en la mayoría de los meningiomas es el gen de la e-cadherina (**CDH1**), que codifica para una proteína de membrana celular importante en la adhesión entre células y también en la morfología de la célula. A pesar de que existen resultados controvertidos sobre la expresión de la e-cadherina y el grado tumoral en meningiomas (11), nuestros resultados concuerdan con los de otros autores que encontraron una expresión elevada de CDH1 en meningiomas independientemente del grado tumoral (103, 104). Por tanto, alteraciones en la adhesión intercelular podrían contribuir a la morfogénesis en estos tumores. Esto viene apoyado por la existencia de varios estudios que indican que el producto del gen *NF2* (merlina), frecuentemente perdido en meningiomas, regula la proliferación mediada por contacto estabilizando los complejos célula-célula mediados por cadherina. De esta manera, una expresión reducida de la merlina podría desestabilizar las uniones célula-célula y promover la proliferación celular (34, 105). Al desestabilizarse estas uniones, no solo aumentan los niveles de e-cadherina, también los niveles de β -catenina, la cual entra en el núcleo y activa la expresión de varios genes implicados en la activación del ciclo celular, como la ciclina D1, lo que concuerda con los resultados hallados en este estudio.

Por otro lado, se ha observado una sobreexpresión del gen **HES7** en el 92% de los meningiomas. Este gen está regulado por la ruta de señalización NOTCH y a su vez, regula otros genes diana (106, 107). La ruta de señalización NOTCH es importante para la comunicación célula-célula y tiene múltiples funciones durante el desarrollo (100, 108). La alteración de la misma ruta contribuye a la génesis de varios tipos de cáncer,

incluyendo los meningiomas (99, 109-111). Existen datos que sugieren que la alteración en la señalización NOTCH tiene un papel oncogénico en cáncer de mama, lo que podría estar favorecido por la cooperación con otras rutas como la ErbB2 o WNT. Esto contrasta con la función de uno de sus componentes, *Notch1*, el cual inhibe el crecimiento tumoral en cáncer de piel y meningiomas (99, 108). La observación de que la señalización NOTCH tiene funciones opuestas en distintos órganos indica que los efectos de la alteración dependen en gran medida del contexto celular, así como de ciertos factores como el tipo celular, los factores de crecimiento del microambiente, y el nivel de actividad de NOTCH (108). La observación de que la mayoría de meningiomas muestran sobreexpresión de *HES7* independientemente del grado tumoral sugiere que la alteración de componentes de esta ruta es una anomalía frecuente, temprana y crítica en el desarrollo de estos tumores, lo que viene apoyado por otros estudios que muestran sobreexpresión de otro componente de la misma familia, el gen *HES1* (*hairy and enhancer of split 1*) (99).

Entre las rutas alteradas en meningiomas hemos identificado algunas no descritas hasta ahora, como las rutas de señalización EGFR y NF- κ B. Asociada a esta última hemos identificado varios miembros de la familia del factor de necrosis tumoral, como ***TNFAIP2*** (*tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2*), ***TNFRSF25*** (*tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25*), ***TNFRSF19L*** (*RELT tumor necrosis factor receptor*) y ***TNFSF10*** (*tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10*); todos ellos conocidos mediadores de angiogénesis y apoptosis. En concreto, la represión del gen *TNFRSF25* ha sido descrita en meningiomas y podría estar produciendo una disminución de la regulación apoptótica de las células tumorales analizadas, y por lo tanto favorecer su crecimiento y progresión (112).

Por tanto, el análisis de la expresión génica en los meningiomas sugiere que la adhesión e integridad intra- e intercelular, la regulación del ciclo celular y determinadas rutas de señalización como la ruta NOTCH, juegan un papel muy importante en el desarrollo de los meningiomas.

El perfil de expresión de microRNAs asociado a meningioma incluye dos microRNAs interesantes debido a las dianas que regulan. El **miR-302a**, mencionado

anteriormente y el **miR-330-3p** regula un gen que codifica para una proteína asociada a la ruta de señalización de TGF- β (113, 114), el gen *CREBBP*. La superfamilia del TGF- β incluye varias proteínas que regulan el crecimiento celular y la diferenciación en múltiples tipos celulares. Entre estas proteínas existen varios supresores de tumores que juegan un papel en la regulación del crecimiento de los meningiomas (113-115). Además, el gen *CREBBP* se ha considerado un gen supresor de tumores en otros tipos de cáncer (116, 117) y a su vez está regulado por otro microRNA alterado en meningiomas, miR-381. Por otra parte, a pesar de que la confirmación del papel regulador de los microRNAs en los meningiomas, requiere confirmación adicional experimental, es consistente con otros estudios de microRNAs que demuestran que son posibles reguladores de la expresión génica en otros tumores (101, 118). La identificación de una firma de microRNAs desregulados en meningiomas, apoya la hipótesis de que alteraciones en los microRNAs podrían constituir un importante mecanismo de regulación génica alternativo en meningiomas.

Perfiles de expresión en recidiva de meningioma

El análisis del perfil de expresión génica comparando muestras al diagnóstico de meningiomas que han recidivado y muestras en la recidiva, reveló que no había diferencias de expresión génica entre ambos grupos. Se ha descrito que los meningiomas más agresivos tienen tendencia a aparecer con alteraciones genéticas más complejas, apoyando la hipótesis de que la formación de tumores más agresivos sigue un modelo de acumulación progresiva de alteraciones citogenéticas (22, 23, 25). Esta acumulación de alteraciones genéticas podría suponerse también en los tumores recurrentes o que progresan. Sin embargo, nuestros resultados, en línea con los de otros autores, mostraron que los tumores recurrentes estudiados presentaban las mismas alteraciones cromosómicas que en el momento del diagnóstico (5, 26). Esto sugiere la posibilidad de que el potencial para recidivar o la mayor agresividad del tumor ya está presente en la primera manifestación del meningioma, al contrario de lo que ocurre en otros tipos de tumores como el de colon (119).

La comparación de meningiomas originales que no han recidivado hasta la fecha y meningiomas recurrentes, reveló un perfil de expresión génica que permitía

distinguir entre ambos grupos y que estaba compuesto, en su mayoría, por genes reprimidos. Entre las rutas en las que participan los genes asociados a recidiva, se encuentran las rutas de señalización MAPK y ciclo celular. Estas rutas habían sido asociadas previamente a recidiva de meningiomas, lo que apoya nuestros resultados (70, 73). Por otro lado, hemos identificado nuevas rutas moleculares que podrían estar implicadas en el desarrollo de recidivas, como invasión, organización y biogénesis del citoesqueleto, ruta de señalización de receptores de insulina o la ruta PPAR (*Peroxisome proliferator activated receptors*). La familia de receptores PPAR está implicada en una gran variedad de procesos biológicos como la regulación de apoptosis, la inducción de la proliferación y detención de ciclo celular en distintos tipos celulares y además regula el ciclo y la proliferación celular en cáncer de colon (120).

Asimismo, se identificó un perfil de expresión de microRNAs que permitía distinguir entre meningiomas originales y recidivas, compuesto en su mayoría por microRNAs sobreexpresados. Estudiando las dianas génicas que regulaban estos microRNAs encontramos que el 16,5% de los genes asociados a recidivas se incluían entre las dianas génicas de los microRNAs diferencialmente expresados, sugiriendo que una fracción de los genes asociados a recidivas podría estar regulada por microRNAs.

De entre los microRNAs sobreexpresados, el **miR-513a-5p** regula el gen *SFRP1* (*secreted frizzled-related protein 1*), y otros genes supresores de tumores y antiapoptóticos reprimidos en las muestras de recidivas, como el gen *ZBTB34* (*zinc finger and BTB domain containing 34*). El **miR-545** regula el gen *PIK3R1* (*phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1*), factor pro-apoptótico reprimido en recidivas que además forma parte de importantes vías de señalización como NF- κ B y AKT. Igualmente, el miR-545, regula el gen *BHLHB3* (*basic helix-loop-helix family, member B3*) reprimido en recidivas. Los genes de esta familia son dianas de la ruta de señalización NOTCH (121). Este gen, en concreto, se ha considerado un posible supresor de tumores en cáncer de pulmón, cuya actividad podría estar mediada por la ciclina D1 (122). Por lo tanto, los microRNAs podrían tener un papel relevante en el mecanismo de la regulación génica en las recidivas de los meningiomas.

Tras la monosomía o delección parcial del cromosoma 22, la pérdida de 1p y 14q son las alteraciones cromosómicas más frecuentes en meningiomas, asociadas además, con un mayor riesgo de recurrencia (5, 7, 16, 20-22, 24, 25, 44, 52, 53, 59, 123). De acuerdo con nuestros resultados, el estudio de la localización cromosómica de los GDEs reveló que la mayoría de ellos se localizaban en 1p, 1q, 6p, 6q y 14q. Estas localizaciones tienen una frecuencia significativamente mayor entre los GDEs que entre las de todos los genes del microarray. Asimismo, observamos que prácticamente todos los GDEs reprimidos en recidiva se localizaban en 1p, 6q y 14q, mientras que la mayoría de GDEs sobreexpresados en recidiva se encontraban en 1q y 6p.

Igualmente, este estudio ha confirmado la delección de 1p en la mayoría de meningiomas recurrentes y en todos los meningiomas originales que han recidivado posteriormente, en consonancia con lo observado por otros autores (5, 26, 59). Por otra parte, algunos tumores no recurrentes que mostraron pérdida de 1p se correspondían con meningiomas atípicos y anaplásicos, en los cuales se ha descrito pérdida de 1p en el 40-75% y 70-100%, respectivamente (7, 9, 11, 112). Además, nuestros datos mostraron que aquellos pacientes que presentaron pérdida de 1p, presentaban un menor tiempo libre de recidiva.

No obstante, hasta la fecha las dianas génicas de estas pérdidas cromosómicas no se han determinado y no se ha confirmado la implicación de supresores de tumores en la recidiva de meningiomas. Los análisis realizados en este trabajo han permitido identificar genes candidatos localizados en estas regiones que podrían estar implicados en la recidiva de meningiomas.

Entre los genes localizados en 1p se encuentra el gen **LMO4** (*LIM domain only 4*, 1p22.3). Se ha descrito que este gen podría modular la señalización de TGF- β a través de su interacción con receptores tipo *Smad*, lo que está de acuerdo con la identificación de alteraciones en esta ruta en recidivas (124). También en 1p, se ha identificado el **miR-200a** (1p36.33) reprimido en recidivas. Saydam y colaboradores han descrito que la represión de miR-200a, contribuye a la tumorigénesis en meningiomas de grado I (84). Nuestros datos, junto con los de Saydam y

colaboradores, señalan el miR-200a como posible diana localizada en 1p, cuya represión estaría asociada a recidiva de meningiomas (84).

En la región 14q se ha identificado el gen candidato **TMEM30B** (*transmembrane protein 30B*, 14q23.1), reprimido en recidivas. Este gen codifica para un factor transmembrana y aunque su función no ha sido bien establecida podría participar en el ciclo celular (125). Sin embargo, son necesarios más estudios para determinar su papel en meningiomas.

Otro gen localizado en 14q, que también está reprimido en la recidiva tumoral, es el gen **LTBP2** (*latent transforming growth factor beta binding protein 2*, 14q24). Este gen pertenece a la familia de proteínas de matriz extracelular LTBPs (proteínas de unión al TGF- β latente), las cuales desempeñan un papel importante en el procesamiento y secreción de factores de la familia del TGF- β , (113, 126, 127). Además, se ha descrito que este gen podría mediar la adhesión celular en células de melanoma (128).

En esta región también hemos identificado la represión del **miR-485-5p** (14q32) en recidivas. Este microRNA regula varias dianas génicas involucradas en rutas alteradas en recidivas incluyendo la fosforilación oxidativa, y las rutas de señalización WNT, NOTCH y PPAR.

La pérdida del cromosoma 6q se ha asociado con la progresión maligna de los meningiomas (19, 60). Esta región contiene los genes candidatos **CTGF** (*connective tissue growth factor*, 6q23), **TMEM30A** (*transmembrane protein 30A*, 6q14.1) y **SESN1** (*sestrin 1*, 6q21), los cuales aparecen reprimidos en meningiomas recurrentes y son factores relacionados con proliferación y diferenciación celular, ciclo celular y reparación del ADN, respectivamente. De forma específica, la expresión del gen **CTGF** está fuertemente regulada y participa en varias rutas de señalización, incluyendo las rutas de señalización TGF- β -Smad y fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K-AKT) (129).

En la región 6p22.1 se observó la sobreexpresión de genes del cluster 1 de las histonas, componentes proteicos que compactan el ADN genómico en el núcleo en una estructura altamente organizada, la cromatina. Se ha descrito en células de mamífero

que las histonas de tipo enlazante, como es la histona H1C, pueden participar en la regulación epigenética de la expresión génica, contribuyendo al mantenimiento o establecimiento de patrones específicos de metilación del ADN (130). Los análisis inmunohistoquímicos llevados a cabo en nuestra serie de meningiomas confirmaron la sobreexpresión de la **HIST1H1C** en la mayoría de recidivas y meningiomas originales que recidivaron, poniendo de manifiesto la importancia de los mecanismos que regulan la transcripción génica a través de la histona 1 en meningiomas recurrentes. Aunque estudios adicionales son necesarios para confirmar el papel de la HIST1H1C en los meningiomas.

Perfil de expresión de meningiomas agresivos

Existe cierto número de meningiomas que en ocasiones presentan un curso clínico más agresivo, incluso tras un diagnóstico benigno o una extirpación quirúrgica completa. Además, los meningiomas atípicos suelen mostrar una amplia variabilidad en su comportamiento clínico e histológico, y algunos de estos tumores presentan perfiles de crecimiento similares a los de meningiomas benignos, mientras que otros manifiestan mayor agresividad clínica. Por estas razones, y para determinar si los meningiomas recurrentes tienen características genéticas y/o biológicas comunes con meningiomas agresivos, hemos identificado un perfil de genes comunes característicos de progresión y recidiva que podría contribuir a una mayor agresividad clínica e histopatológica de los meningiomas.

Para evaluar la capacidad de clasificación de este perfil génico común, se llevó a cabo un *cluster* o agrupación jerárquica utilizando los datos de expresión de 136 muestras de meningiomas procedentes de este y otros dos estudios con los 49 genes del perfil de agresividad. Este *cluster* reveló dos grupos moleculares: uno de ellos compuesto por la mayoría de meningiomas anaplásicos y atípicos con altos índices de proliferación, así como por la mayoría de recidivas o tumores que recidivaron posteriormente, mientras que el otro grupo estaba compuesto principalmente por meningiomas benignos o tumores que no habían recidivado. Estos resultados sugieren que este perfil de 49 genes podría ser de gran utilidad a la hora de distinguir entre meningiomas de mayor o menor agresividad.

En línea con estos resultados, Carvalho y colaboradores propusieron la clasificación de los meningiomas en dos grupos moleculares, uno de baja proliferación, que incluía la mayoría de meningiomas benignos de crecimiento lento y otro de alta proliferación compuesto por meningiomas malignos (75).

Con respecto a los patrones de expresión de los genes comunes asociados a progresión y recidiva, los niveles de expresión génica (represión y sobreexpresión) de cada uno de los genes eran consistentes entre todos los estudios utilizados en la identificación de este perfil, tanto en meningiomas de alto grado como en recurrentes. Además, la mayoría de los genes identificados en los distintos estudios estaban reprimidos, es decir, la represión génica fue característica de los tumores más agresivos, lo que concuerda con estudios previos de expresión génica en meningiomas y también con que la mayoría de las alteraciones cromosómicas detectadas en meningiomas son pérdidas de material genético (63, 70, 73-75, 77).

El perfil génico de tumores más agresivos incluía genes asociados a ciclo celular y proliferación como **CKS2**, **TMEM30B** o **UCHL1**, genes asociados a rutas alteradas en meningiomas como la ruta WNT en la que participan **SFRP1**, **SFRP4** (*secreted frizzled-related protein 4*) y **SERPINF1** (*serpin peptidase inhibitor, class F*), o la ruta TGF- β con los genes **LMO4** y **LTBP2** (11). Como se ha mencionado anteriormente, estos dos genes están asociados a la ruta de señalización del TGF- β , y se encuentran alterados no solo en recidivas, sino también en meningiomas de alto grado. Sin embargo, la función de estos genes en la alteración de la señalización del TGF- β y su relación con formas más agresivas de meningiomas debe ser analizada en mayor detalle.

Entre los genes asociados a una mayor agresividad en los meningiomas, el gen **CKS2** fue uno de los genes más consistentemente alterados, encontrándose sobreexpresión de **CKS2** en meningiomas de alto grado (II y III) y recurrentes, en 6 de los 7 estudios. El análisis de Kaplan-Meier con datos de expresión de **CKS2**, reveló que niveles elevados de expresión del ARNm de **CKS2** se asocian con un menor tiempo libre de recidiva en meningiomas. Además, de acuerdo con estos resultados, Menghi y colaboradores han identificado el gen **CKS2** como un posible marcador asociado a la recidiva y transformación maligna de los meningiomas (72). **CKS2** es esencial en el

control del ciclo celular y ha sido identificado como diana transcripcional, estando regulado por el supresor tumoral p53 (131-134). Asimismo, se ha sugerido que *CKS2* podría estar involucrado en la progresión de cáncer gástrico y promover la tumorigénesis en cáncer de próstata al proteger las células de la apoptosis (131-134).

La proteína *UCHL1* pertenece a la familia de enzimas desubiquitinizantes que regulan los niveles de ubiquitina en células en las que la degradación proteica depende de ubiquitina. Existen datos controvertidos en relación con las propiedades anti- o protumorales de *UCHL1* dependiendo del tipo tumoral (77, 135-138). Se ha propuesto este gen como supresor tumoral en varios tipos de cáncer y la hipermetilación del promotor como mecanismo de inactivación génica (94, 135, 137-139). De acuerdo con este silenciamiento génico por hipermetilación del promotor en otros tipos tumorales, hemos estudiado la hipermetilación del promotor del gen *UCHL1* en meningiomas. Nuestros datos confirmaron la inactivación epigenética de *UCHL1* por hipermetilación del promotor en meningiomas de alto grado y recurrentes, por lo que podría ser uno de los posibles mecanismos de silenciamiento transcripcional de este gen en los meningiomas más agresivos.

Los genes *SFRP1* y *SFRP4*, pertenecen a la familia de proteínas secretadas *Frizzled* (SFRPs) y están estrechamente asociados a la ruta de señalización WNT, ya que son capaces de reprimir esta ruta al formar complejos inhibidores con receptores específicos (140). Es interesante mencionar que *SFRP1* ha sido propuesto como supresor tumoral en varios tipos de cáncer (141-143), y recientemente se ha descrito una represión por hipermetilación del promotor de este gen en gliomas (141). Nuestros datos mostraron una represión de *SFRP1* en meningiomas recurrentes y de alto grado y una hipermetilación del promotor de *SFRP1* como posible mecanismo de inactivación génica en meningiomas agresivos.

Conclusiones

1. El análisis de expresión génica a gran escala de los meningiomas permitió identificar una firma molecular que incluye genes implicados en el desarrollo de estos tumores. En su mayoría, estos genes y las rutas en las que participan están reprimidos. También se identificaron genes sobreexpresados como *CCND1*, *HES7* o *CDH1*, implicados en la activación del ciclo celular a través de alteraciones en las uniones célula-célula y la señalización NOTCH. La firma molecular de meningiomas sugiere que la adhesión intercelular y determinadas rutas de señalización como la ruta NOTCH o NF- κ B, juegan un papel muy importante en el desarrollo de los meningiomas.
2. El análisis de expresión de microRNAs identificó un perfil alterado que podría contribuir al desarrollo de meningiomas mediante la regulación post-transcripcional de sus dianas génicas. Entre los microRNAs más relevantes, el miR-330-3p y miR-302a regulan genes implicados en ciclo celular y en la señalización del TGF- β , tales como la *CCND1* o el gen *CREBBP*.
3. El análisis de expresión génica en las muestras recurrentes y al diagnóstico determinó que las alteraciones en la expresión génica están presentes en la primera manifestación del tumor, sugiriendo que algunos casos, a pesar de presentar una patología histológicamente benigna, muestran perfiles de expresión similares a aquellos de muestras que clínicamente son más agresivas.
4. En este trabajo se ha definido un perfil de expresión génica y de microRNAs diferencial que permite distinguir entre meningiomas originales y recidivas, proponiendo genes y microRNAs que podrían estar involucrados en el desarrollo de recidivas como *TMEM30B*, *CTGF*, *HIST1H1C* y *LMO4* o miR-200a, miR-545 y miR-513-5p.
5. El análisis de las localizaciones cromosómicas de los genes alterados en recidiva mostró que estos genes se localizaban en las regiones 1p, 1q, 6p, 6q y 14q, estando en su mayoría reprimidos, lo que concuerda con la mayor frecuencia de pérdida de material genético asociada a estos tumores.
6. La pérdida del cromosoma 1p fue más frecuente en meningiomas recurrentes y estaba asociada a un menor tiempo libre de recidiva, lo que sugiere que esta alteración molecular es un marcador pronóstico de la recidiva del tumor.

7. La comparación de los perfiles de expresión génica de tumores histopatológicamente más agresivos y de tumores recurrentes permitió identificar un perfil génico compuesto por 49 genes alterados que podría contribuir a la mayor agresividad clínica de los meningiomas.
8. La firma molecular de agresividad en meningiomas está compuesta por marcadores que podrían proporcionar información adicional sobre el potencial de los meningiomas para progresar y/o recidivar, como *SFRP1* o *LMO4*, implicados en ciclo celular, y en las rutas de señalización WNT y TGF- β ; o el gen *CKS2*, que participa en la progresión del ciclo celular.
9. La expresión del gen *CKS2* fue más frecuente en meningiomas recurrentes y de alto grado, y se encontró que una expresión elevada de *CKS2* estaba fuertemente asociada al tiempo de recidiva.
10. La hipermetilación de los promotores de *SFRP1* y *UCHL1* se ha asociado a la inactivación de dichos genes y se ha observado de manera más frecuente en meningiomas de alto grado y recidivas.

Bibliografía

1. Yee G. RR, Philips C et al. CBTRUS Statistical Report:Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in Eighteen States in 2004-2008. Hinsdale, IL., 2012.
2. Vilar S, Gil M. Protocolo de los tumores del Sistema Nervioso. Permanyer 2008.
3. Yee G. RR, Philips C et al. CBTRUS Statistical Report:Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in Eighteen States in 2002-2006. Hinsdale, IL., 2009.
4. SIMPSON D. The recurrence of intracranial meningiomas after surgical treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1957;20;22-39.
5. Maillo A, Orfao A, Espinosa A, Sayagués J, Merino M, Sousa P, Lara M, Tabernero M. Early recurrences in histologically benign/grade I meningiomas are associated with large tumors and coexistence of monosomy 14 and del(1p36) in the ancestral tumor cell clone. *Neuro Oncol* 2007;9;438-46.
6. Mirimanoff RO, Dosoretz DE, Linggood RM, Ojemann RG, Martuza RL. Meningioma: analysis of recurrence and progression following neurosurgical resection. *J Neurosurg* 1985;62;18-24.
7. Perry A, Gutmann D, Reifenberger G. Molecular pathogenesis of meningiomas. *J Neurooncol* 2004;70;183-202.
8. Perry A, Stafford SL, Scheithauer BW, Suman VJ, Lohse CM. Meningioma grading: an analysis of histologic parameters. *Am J Surg Pathol* 1997;21;1455-65.
9. Perry A, Louis D, Scheithauer B, Budka H, von Deimling A, eds. World Health Organization Classification of Tumours. Lyon: IARC Press, 2007.
10. Perry A, Scheithauer BW, Stafford SL, Lohse CM, Wollan PC. "Malignancy" in meningiomas: a clinicopathologic study of 116 patients, with grading implications. *Cancer* 1999;85;2046-56.
11. Mawrin C, Perry A. Pathological classification and molecular genetics of meningiomas. *J Neurooncol* 2010;99;379-91.
12. Riemenschneider M, Perry A, Reifenberger G. Histological classification and molecular genetics of meningiomas. *Lancet Neurol* 2006;5;1045-54.
13. Lusa E, Gutmann D. Meningioma: an update. *Curr Opin Neurol* 2004;17;687-92.
14. Konstantinidou A, Korkolopoulou P, Mahera H, Kotsiakis X, Hranioti S, Eftychiadis C, Patsouris E. Hormone receptors in non-malignant meningiomas correlate with apoptosis, cell proliferation and recurrence-free survival. *Histopathology* 2003;43;280-90.

15. Simon M, Boström J, Hartmann C. Molecular genetics of meningiomas: from basic research to potential clinical applications. *Neurosurgery* 2007;60;787-98; discussion - 98.
16. Buckley P, Jarbo C, Menzel U, Mathiesen T, Scott C, Gregory S, Langford C, Dumanski J. Comprehensive DNA copy number profiling of meningioma using a chromosome 1 tiling path microarray identifies novel candidate tumor suppressor loci. *Cancer Res* 2005;65;2653-61.
17. Lomas J, Bello MJ, Arjona D, Alonso ME, Martinez-Glez V, Lopez-Marin I, Amiñoso C, de Campos JM, Isla A, Vaquero J, Rey JA. Genetic and epigenetic alteration of the NF2 gene in sporadic meningiomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2005;42;314-9.
18. Martinez-Glez V, Franco-Hernandez C, Rey J. Microarray gene expression profiling in meningiomas and schwannomas. *Curr Med Chem* 2008;15;826-33.
19. Weber R, Boström J, Wolter M, Baudis M, Collins V, Reifenberger G, Lichter P. Analysis of genomic alterations in benign, atypical, and anaplastic meningiomas: toward a genetic model of meningioma progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94;14719-24.
20. Taberero MD, Maíllo A, Nieto AB, Diez-Tascón C, Lara M, Sousa P, Otero A, Castrillo A, Patino-Alonso MeC, Espinosa A, Mackintosh C, de Alava E, Orfao A. Delineation of commonly deleted chromosomal regions in meningiomas by high-density single nucleotide polymorphism genotyping arrays. *Genes Chromosomes Cancer* 2012;51;606-17.
21. Nakane Y, Natsume A, Wakabayashi T, Oi S, Ito M, Inao S, Saito K, Yoshida J. Malignant transformation-related genes in meningiomas: allelic loss on 1p36 and methylation status of p73 and RASSF1A. *J Neurosurg* 2007;107;398-404.
22. Simon M, von Deimling A, Larson JJ, Wellenreuther R, Kaskel P, Waha A, Warnick RE, Tew JM, Menon AG. Allelic losses on chromosomes 14, 10, and 1 in atypical and malignant meningiomas: a genetic model of meningioma progression. *Cancer Res* 1995;55;4696-701.
23. Perry A, Jenkins RB, Dahl RJ, Moertel CA, Scheithauer BW. Cytogenetic analysis of aggressive meningiomas: possible diagnostic and prognostic implications. *Cancer* 1996;77;2567-73.
24. Leone PE, Bello MJ, de Campos JM, Vaquero J, Sarasa JL, Pestaña A, Rey JA. NF2 gene mutations and allelic status of 1p, 14q and 22q in sporadic meningiomas. *Oncogene* 1999;18;2231-9.

25. Ishino S, Hashimoto N, Fushiki S, Date K, Mori T, Fujimoto M, Nakagawa Y, Ueda S, Abe T, Inazawa J. Loss of material from chromosome arm 1p during malignant progression of meningioma revealed by fluorescent in situ hybridization. *Cancer* 1998;83;360-6.
26. Al-Mefty O, Kadri PA, Pravdenkova S, Sawyer JR, Stangeby C, Husain M. Malignant progression in meningioma: documentation of a series and analysis of cytogenetic findings. *J Neurosurg* 2004;101;210-8.
27. Evans DG. Neurofibromatosis type 2 (NF2): a clinical and molecular review. *Orphanet J Rare Dis* 2009;4;16.
28. Wellenreuther R, Kraus JA, Lenartz D, Menon AG, Schramm J, Louis DN, Ramesh V, Gusella JF, Wiestler OD, von Deimling A. Analysis of the neurofibromatosis 2 gene reveals molecular variants of meningioma. *Am J Pathol* 1995;146;827-32.
29. Martinez-Glez V, Franco-Hernandez C, Alvarez L, De Campos JM, Isla A, Vaquero J, Lassaletta L, Casartelli C, Rey JA. Meningiomas and schwannomas: molecular subgroup classification found by expression arrays. *Int J Oncol* 2009;34;493-504.
30. Rutledge MH, Sarrazin J, Rangaratnam S, Phelan CM, Twist E, Merel P, Delattre O, Thomas G, Nordenskjold M, Collins VP, et al. Evidence for the complete inactivation of the NF2 gene in the majority of sporadic meningiomas. *Nat Genet* 1994;6;180-4.
31. Kino T, Takeshima H, Nakao M, Nishi T, Yamamoto K, Kimura T, Saito Y, Kochi M, Kuratsu J, Saya H, Ushio Y. Identification of the cis-acting region in the NF2 gene promoter as a potential target for mutation and methylation-dependent silencing in schwannoma. *Genes Cells* 2001;6;441-54.
32. Hansson CM, Buckley PG, Grigelioniene G, Piotrowski A, Hellström AR, Mantripragada K, Jarbo C, Mathiesen T, Dumanski JP. Comprehensive genetic and epigenetic analysis of sporadic meningioma for macro-mutations on 22q and micro-mutations within the NF2 locus. *BMC Genomics* 2007;8;16.
33. van Tilborg AA, Morolli B, Giphart-Gassler M, de Vries A, van Geenen DA, Lurkin I, Kros JM, Zwarthoff EC. Lack of genetic and epigenetic changes in meningiomas without NF2 loss. *J Pathol* 2006;208;564-73.
34. Curto M, McClatchey AI. Nf2/Merlin: a coordinator of receptor signalling and intercellular contact. *Br J Cancer* 2008;98;256-62.
35. Hamaratoglu F, Willecke M, Kango-Singh M, Nolo R, Hyun E, Tao C, Jafar-Nejad H, Halder G. The tumour-suppressor genes NF2/Merlin and Expanded act through Hippo signalling to regulate cell proliferation and apoptosis. *Nat Cell Biol* 2006;8;27-36.
36. Kimura Y, Koga H, Araki N, Mugita N, Fujita N, Takeshima H, Nishi T, Yamashita T, Saido TC, Yamasaki T, Moritake K, Saya H, Nakao M. The involvement of calpain-

- dependent proteolysis of the tumor suppressor NF2 (merlin) in schwannomas and meningiomas. *Nat Med* 1998;4;915-22.
37. Gutmann D, Donahoe J, Perry A, Lemke N, Gorse K, Kittinyom K, Rempel S, Gutierrez J, Newsham I. Loss of DAL-1, a protein 4.1-related tumor suppressor, is an important early event in the pathogenesis of meningiomas. *Hum Mol Genet* 2000;9;1495-500.
 38. Martinez-Glez V, Bello M, Franco-Hernandez C, De Campos J, Isla A, Vaquero J, Rey J. Mutational analysis of the DAL-1/4.1B tumour-suppressor gene locus in meningiomas. *Int J Mol Med* 2005;16;771-4.
 39. Surace E, Lusi E, Murakami Y, Scheithauer B, Perry A, Gutmann D. Loss of tumor suppressor in lung cancer-1 (TSLC1) expression in meningioma correlates with increased malignancy grade and reduced patient survival. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004;63;1015-27.
 40. Yageta M, Kuramochi M, Masuda M, Fukami T, Fukuhara H, Maruyama T, Shibuya M, Murakami Y. Direct association of TSLC1 and DAL-1, two distinct tumor suppressor proteins in lung cancer. *Cancer Res* 2002;62;5129-33.
 41. Xiao G, Gallagher R, Shetler J, Skele K, Altomare D, Pestell R, Jhanwar S, Testa J. The NF2 tumor suppressor gene product, merlin, inhibits cell proliferation and cell cycle progression by repressing cyclin D1 expression. *Mol Cell Biol* 2005;25;2384-94.
 42. James M, Lelke J, Maccollin M, Plotkin S, Stemmer-Rachamimov A, Ramesh V, Gusella J. Modeling NF2 with human arachnoidal and meningioma cell culture systems: NF2 silencing reflects the benign character of tumor growth. *Neurobiol Dis* 2008;29;278-92.
 43. Striedinger K, VandenBerg S, Baia G, McDermott M, Gutmann D, Lal A. The neurofibromatosis 2 tumor suppressor gene product, merlin, regulates human meningioma cell growth by signaling through YAP. *Neoplasia* 2008;10;1204-12.
 44. Shen Y, Nunes F, Stemmer-Rachamimov A, James M, Mohapatra G, Plotkin S, Betensky R, Engler D, Roy J, Ramesh V, Gusella J. Genomic profiling distinguishes familial multiple and sporadic multiple meningiomas. *BMC Med Genomics* 2009;2;42.
 45. Peyrard M, Fransson I, Xie YG, Han FY, Ruttledge MH, Swahn S, Collins JE, Dunham I, Collins VP, Dumanski JP. Characterization of a new member of the human beta-adaptin gene family from chromosome 22q12, a candidate meningioma gene. *Hum Mol Genet* 1994;3;1393-9.
 46. Guilbaud C, Peyrard M, Fransson I, Clifton SW, Roe BA, Carter NP, Dumanski JP. Characterization of the mouse beta-prime adaptin gene; cDNA sequence, genomic structure, and chromosomal localization. *Mamm Genome* 1997;8;651-6.

47. Wozniak K, Piaskowski S, Gresner SM, Golanska E, Bieniek E, Bigoszewska K, Sikorska B, Szybka M, Kulczycka-Wojdala D, Zakrzewska M, Zawlik I, Papierz W, Stawski R, Jaskolski DJ, Och W, Sieruta M, Liberski PP, Rieske P. BCR expression is decreased in meningiomas showing loss of heterozygosity of 22q within a new minimal deletion region. *Cancer Genet Cytogenet* 2008;183:14-20.
48. Barski D, Wolter M, Reifenberger G, Riemenschneider MJ. Hypermethylation and transcriptional downregulation of the TIMP3 gene is associated with allelic loss on 22q12.3 and malignancy in meningiomas. *Brain Pathol* 2010;20:623-31.
49. Lekanne Deprez RH, Groen NA, van Biezen NA, Hagemeijer A, van Drunen E, Koper JW, Avezaat CJ, Bootsma D, Zwarthoff EC. A t(4;22) in a meningioma points to the localization of a putative tumor-suppressor gene. *Am J Hum Genet* 1991;48:783-90.
50. Oruetxebarria I, Venturini F, Kekarainen T, Houweling A, Zuijderduijn LM, Mohd-Sarip A, Vries RG, Hoeben RC, Verrijzer CP. P16INK4a is required for hSNF5 chromatin remodeler-induced cellular senescence in malignant rhabdoid tumor cells. *J Biol Chem* 2004;279:3807-16.
51. Elam C, Hesson L, Vos MD, Eckfeld K, Ellis CA, Bell A, Krex D, Birrer MJ, Latif F, Clark GJ. RRP22 is a farnesylated, nucleolar, Ras-related protein with tumor suppressor potential. *Cancer Res* 2005;65:3117-25.
52. Bello M, de Campos J, Kusak M, Vaquero J, Sarasa J, Pestaña A, Rey J. Allelic loss at 1p is associated with tumor progression of meningiomas. *Genes Chromosomes Cancer* 1994;9:296-8.
53. Bello M, de Campos J, Vaquero J, Kusak M, Sarasa J, Rey J. High-resolution analysis of chromosome arm 1p alterations in meningioma. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;120:30-6.
54. Boström J, Meyer-Puttlitz B, Wolter M, Blaschke B, Weber R, Lichter P, Ichimura K, Collins V, 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* 2001;159:661-9.
55. Piaskowski S, Rieske P, Szybka M, Wozniak K, Bednarek A, Płuciennik E, Jaskolski D, Sikorska B, Liberski P. GADD45A and EPB41 as tumor suppressor genes in meningioma pathogenesis. *Cancer Genet Cytogenet* 2005;162:63-7.
56. Moll UM, Slade N. p53 and p73: roles in development and tumor formation. *Mol Cancer Res* 2004;2:371-86.

57. Müller P, Henn W, Niedermayer I, Ketter R, Feiden W, Steudel WI, Zang KD, Steilen-Gimbel H. Deletion of chromosome 1p and loss of expression of alkaline phosphatase indicate progression of meningiomas. *Clin Cancer Res* 1999;5:3569-77.
58. Tabertero M, Maillo A, Gil-Bellosta C, Castrillo A, Sousa P, Merino M, Orfao A. Gene Expression Profiles of Meningiomas are Associated with Tumor Cytogenetics and Patient Outcome. *Brain Pathol* 2008.
59. Cai D, Banerjee R, Scheithauer B, Lohse C, Kleinschmidt-Demasters B, Perry A. Chromosome 1p and 14q FISH analysis in clinicopathologic subsets of meningioma: diagnostic and prognostic implications. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001;60:628-36.
60. Ozaki S, Nishizaki T, Ito H, Sasaki K. Comparative genomic hybridization analysis of genetic alterations associated with malignant progression of meningioma. *J Neurooncol* 1999;41:167-74.
61. Li Y, Yang J, Li S, Zhang J, Zheng J, Hou W, Zhao H, Guo Y, Liu X, Dou K, Situ Z, Yao L. N-myc downstream-regulated gene 2, a novel estrogen-targeted gene, is involved in the regulation of Na⁺/K⁺-ATPase. *J Biol Chem* 2011;286:32289-99.
62. Tepel M, Roerig P, Wolter M, Gutmann DH, Perry A, Reifenberger G, Riemenschneider MJ. Frequent promoter hypermethylation and transcriptional downregulation of the NDRG2 gene at 14q11.2 in primary glioblastoma. *Int J Cancer* 2008;123:2080-6.
63. Lusi E, Watson M, Chicoine M, Lyman M, Roerig P, Reifenberger G, Gutmann D, Perry A. Integrative genomic analysis identifies NDRG2 as a candidate tumor suppressor gene frequently inactivated in clinically aggressive meningioma. *Cancer Res* 2005;65:7121-6.
64. Liu Y, Pang J, Dong S, Mao B, Poon W, Ng H. Aberrant CpG island hypermethylation profile is associated with atypical and anaplastic meningiomas. *Hum Pathol* 2005;36:416-25.
65. Zhang X, Gejman R, Mahta A, Zhong Y, Rice KA, Zhou Y, Cheunsuchon P, Louis DN, Klibanski A. Maternally expressed gene 3, an imprinted noncoding RNA gene, is associated with meningioma pathogenesis and progression. *Cancer Res* 2010;70:2350-8.
66. Perry A, Banerjee R, Lohse CM, Kleinschmidt-DeMasters BK, Scheithauer BW. A role for chromosome 9p21 deletions in the malignant progression of meningiomas and the prognosis of anaplastic meningiomas. *Brain Pathol* 2002;12:183-90.
67. Cai D, James C, Scheithauer B, Couch F, Perry A. PS6K amplification characterizes a small subset of anaplastic meningiomas. *Am J Clin Pathol* 2001;115:213-8.

68. Surace E, Lusic E, Haipok C, Gutmann D. Functional significance of S6K overexpression in meningioma progression. *Ann Neurol* 2004;56:295-8.
69. Büschges R, Ichimura K, Weber RG, Reifenberger G, Collins VP. Allelic gain and amplification on the long arm of chromosome 17 in anaplastic meningiomas. *Brain Pathol* 2002;12:145-53.
70. Lee Y, Liu J, Patel S, Cloughesy T, Lai A, Farooqi H, Seligson D, Dong J, Liao L, Becker D, Mischel P, Shams S, Nelson S. Genomic landscape of meningiomas. *Brain Pathol* 2010;20:751-62.
71. Watson M, Gutmann D, Peterson K, Chicoine M, Kleinschmidt-DeMasters B, Brown H, Perry A. Molecular characterization of human meningiomas by gene expression profiling using high-density oligonucleotide microarrays. *Am J Pathol* 2002;161:665-72.
72. Menghi F, Orzan FN, Eoli M, Farinotti M, Maderna E, Pisati F, Bianchessi D, Valletta L, Lodrini S, Galli G, Anghileri E, Pellegatta S, Pollo B, Finocchiaro G. DNA microarray analysis identifies CKS2 and LEPR as potential markers of meningioma recurrence. *Oncologist* 2011;16:1440-50.
73. Fèvre-Montange M, Champier J, Durand A, Wierinckx A, Honnorat J, Guyotat J, Jouvett A. Microarray gene expression profiling in meningiomas: differential expression according to grade or histopathological subtype. *Int J Oncol* 2009;35:1395-407.
74. Keller A, Ludwig N, Backes C, Romeike B, Comtesse N, Henn W, Steudel W, Mawrin C, Lenhof H, Meese E. Genome wide expression profiling identifies specific deregulated pathways in meningioma. *Int J Cancer* 2009;124:346-51.
75. Carvalho L, Smirnov I, Baia G, Modrusan Z, Smith J, Jun P, Costello J, McDermott M, Vandenberg S, Lal A. Molecular signatures define two main classes of meningiomas. *Mol Cancer* 2007;6:64.
76. Lusic E, Chicoine M, Perry A. High throughput screening of meningioma biomarkers using a tissue microarray. *J Neurooncol* 2005;73:219-23.
77. Wrobel G, Roerig P, Kokocinski F, Neben K, Hahn M, Reifenberger G, Lichter P. Microarray-based gene expression profiling of benign, atypical and anaplastic meningiomas identifies novel genes associated with meningioma progression. *Int J Cancer* 2005;114:249-56.
78. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004;431:350-5.
79. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116:281-97.
80. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 2004;432:231-5.

81. Zhang L, Huang J, Yang N, Greshock J, Megraw MS, Giannakakis A, Liang S, Naylor TL, Barchetti A, Ward MR, Yao G, Medina A, O'brien-Jenkins A, Katsaros D, Hatzigeorgiou A, Gimotty PA, Weber BL, Coukos G. microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103;9136-41.
82. Zhang J, Han L, Ge Y, Zhou X, Zhang A, Zhang C, Zhong Y, You Y, Pu P, Kang C. miR-221/222 promote malignant progression of glioma through activation of the Akt pathway. *Int J Oncol* 2010;36;913-20.
83. Shi ZM, Wang J, Yan Z, You YP, Li CY, Qian X, Yin Y, Zhao P, Wang YY, Wang XF, Li MN, Liu LZ, Liu N, Jiang BH. MiR-128 Inhibits Tumor Growth and Angiogenesis by Targeting p70S6K1. *PLoS One* 2012;7;e32709.
84. Saydam O, Shen Y, Würdinger T, Senol O, Boke E, James M, Tannous B, Stemmer-Rachamimov A, Yi M, Stephens R, Fraefel C, Gusella J, Krichevsky A, Breakefield X. Downregulated microRNA-200a in meningiomas promotes tumor growth by reducing E-cadherin and activating the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Mol Cell Biol* 2009;29;5923-40.
85. Vaquerizas JM, Dopazo J, Díaz-Uriarte R. DNMAID: web-based diagnosis and normalization for microarray data. *Bioinformatics* 2004;20;3656-8.
86. Yang YH, Dudoit S, Luu P, Lin DM, Peng V, Ngai J, Speed TP. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res* 2002;30;e15.
87. Rainer J, Sanchez-Cabo F, Stocker G, Sturn A, Trajanoski Z. CARMAweb: comprehensive R- and bioconductor-based web service for microarray data analysis. *Nucleic Acids Res* 2006;34;W498-503.
88. Montaner D, Tárraga J, Huerta-Cepas J, Burguet J, Vaquerizas JM, Conde L, Minguez P, Vera J, Mukherjee S, Valls J, Pujana MA, Alloza E, Herrero J, Al-Shahrour F, Dopazo J. Next station in microarray data analysis: GEPAS. *Nucleic Acids Res* 2006;34;W486-91.
89. Shamir R, Maron-Katz A, Tanay A, Linhart C, Steinfeld I, Sharan R, Shiloh Y, Elkon R. EXPANDER--an integrative program suite for microarray data analysis. *BMC Bioinformatics* 2005;6;232.
90. Subramanian A, Tamayo P, Mootha V, Mukherjee S, Ebert B, Gillette M, Paulovich A, Pomeroy S, Golub T, Lander E, Mesirov J. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102;15545-50.
91. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005;120;15-20.

92. Maragkakis M, Reczko M, Simossis VA, Alexiou P, Papadopoulos GL, Dalamagas T, Giannopoulos G, Goumas G, Koukis E, Kourtis K, Vergoulis T, Koziris N, Sellis T, Tsanakas P, Hatzigeorgiou AG. DIANA-microT web server: elucidating microRNA functions through target prediction. *Nucleic Acids Res* 2009;37;W273-6.
93. Krek A, Grün D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, MacMenamin P, da Piedade I, Gunsalus KC, Stoffel M, Rajewsky N. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* 2005;37;495-500.
94. Okochi-Takada E, Nakazawa K, Wakabayashi M, Mori A, Ichimura S, Yasugi T, Ushijima T. Silencing of the UCHL1 gene in human colorectal and ovarian cancers. *Int J Cancer* 2006;119;1338-44.
95. Sauter G, Simon R, Hillan K. Tissue microarrays in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2;962-72.
96. Palacios J, Honrado E, Osorio A, Cazorla A, Sarrió D, Barroso A, Rodríguez S, Cigudosa J, Díez O, Alonso C, Lerma E, Sánchez L, Rivas C, Benítez J. Immunohistochemical characteristics defined by tissue microarray of hereditary breast cancer not attributable to BRCA1 or BRCA2 mutations: differences from breast carcinomas arising in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Clin Cancer Res* 2003;9;3606-14.
97. Perry A, Stafford S, Scheithauer B, Suman V, Lohse C. The prognostic significance of MIB-1, p53, and DNA flow cytometry in completely resected primary meningiomas. *Cancer* 1998;82;2262-9.
98. Pérez-Magán E, Rodríguez de Lope A, Ribalta T, Ruano Y, Campos-Martín Y, Pérez-Bautista G, García JF, García-Claver A, Fiaño C, Hernández-Moneo JL, Mollejo M, Meléndez B. Differential expression profiling analyses identifies downregulation of 1p, 6q, and 14q genes and overexpression of 6p histone cluster 1 genes as markers of recurrence in meningiomas. *Neuro Oncol* 2010;12;1278-90.
99. Cuevas I, Slocum A, Jun P, Costello J, Bollen A, Riggins G, McDermott M, Lal A. Meningioma transcript profiles reveal deregulated Notch signaling pathway. *Cancer Res* 2005;65;5070-5.
100. Ragel BT, Jensen RL. Aberrant signaling pathways in meningiomas. *J Neurooncol* 2010;99;315-24.
101. Chen CZ. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *N Engl J Med* 2005;353;1768-71.
102. Diehl JA. Cycling to cancer with cyclin D1. *Cancer Biol Ther* 2002;1;226-31.
103. Brunner EC, Romeike BF, Jung M, Comtesse N, Meese E. Altered expression of beta-catenin/E-cadherin in meningiomas. *Histopathology* 2006;49;178-87.

104. Figarella-Branger D, Pellissier JF, Bouillot P, Bianco N, Mayan M, Grisoli F, Rougon G. Expression of neural cell-adhesion molecule isoforms and epithelial cadherin adhesion molecules in 47 human meningiomas: correlation with clinical and morphological data. *Mod Pathol* 1994;7;752-61.
105. Lallemand D, Curto M, Saotome I, Giovannini M, McClatchey AI. NF2 deficiency promotes tumorigenesis and metastasis by destabilizing adherens junctions. *Genes Dev* 2003;17;1090-100.
106. Iso T, Kedes L, Hamamori Y. HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J Cell Physiol* 2003;194;237-55.
107. Bessho Y, Miyoshi G, Sakata R, Kageyama R. Hes7: a bHLH-type repressor gene regulated by Notch and expressed in the presomitic mesoderm. *Genes Cells* 2001;6;175-85.
108. Bolós V, Grego-Bessa J, de la Pompa JL. Notch signaling in development and cancer. *Endocr Rev* 2007;28;339-63.
109. Hansson EM, Lendahl U, Chapman G. Notch signaling in development and disease. *Semin Cancer Biol* 2004;14;320-8.
110. Purow BW, Haque RM, Noel MW, Su Q, Burdick MJ, Lee J, Sundaresan T, Pastorino S, Park JK, Mikolaenko I, Maric D, Eberhart CG, Fine HA. Expression of Notch-1 and its ligands, Delta-like-1 and Jagged-1, is critical for glioma cell survival and proliferation. *Cancer Res* 2005;65;2353-63.
111. Baia G, Stifani S, Kimura E, McDermott M, Pieper R, Lal A. Notch activation is associated with tetraploidy and enhanced chromosomal instability in meningiomas. *Neoplasia* 2008;10;604-12.
112. Martínez-Glez V, F-HC, Peña-Granero C., Rey J.A. Oncogenes and Tumor Suppressor Genes Expression in Meningiomas. *MAPFRE MEDICINA*, 2007.
113. Johnson M, Okediji E, Woodard A. Transforming growth factor-beta effects on meningioma cell proliferation and signal transduction pathways. *J Neurooncol* 2004;66;9-16.
114. Johnson MD, Shaw AK, O'Connell MJ, Sim FJ, Moses HL. Analysis of transforming growth factor β receptor expression and signaling in higher grade meningiomas. *J Neurooncol* 2011;103;277-85.
115. Piek E, Roberts AB. Suppressor and oncogenic roles of transforming growth factor-beta and its signaling pathways in tumorigenesis. *Adv Cancer Res* 2001;83;1-54.
116. Ward R, Johnson M, Shridhar V, van Deursen J, Couch FJ. CBP truncating mutations in ovarian cancer. *J Med Genet* 2005;42;514-8.

117. Kishimoto M, Kohno T, Okudela K, Otsuka A, Sasaki H, Tanabe C, Sakiyama T, Hiramata C, Kitabayashi I, Minna JD, Takenoshita S, Yokota J. Mutations and deletions of the CBP gene in human lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11;512-9.
118. Ambros V, Chen X. The regulation of genes and genomes by small RNAs. *Development* 2007;134;1635-41.
119. Kerr D. Clinical development of gene therapy for colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3;615-22.
120. Boitier E, Gautier JC, Roberts R. Advances in understanding the regulation of apoptosis and mitosis by peroxisome-proliferator activated receptors in pre-clinical models: relevance for human health and disease. *Comp Hepatol* 2003;2;3.
121. Davis RL, Turner DL. Vertebrate hairy and Enhancer of split related proteins: transcriptional repressors regulating cellular differentiation and embryonic patterning. *Oncogene* 2001;20;8342-57.
122. Falvella FS, Colombo F, Spinola M, Campiglio M, Pastorino U, Dragani TA. BHLHB3: a candidate tumor suppressor in lung cancer. *Oncogene* 2008;27;3761-4.
123. Tabernero M, Espinosa A, Maíllo A, Sayagués J, Alguero MC, Lumbreras E, Díaz P, Gonçalves J, Onzain I, Merino M, Morales F, Orfao A. Characterization of chromosome 14 abnormalities by interphase in situ hybridization and comparative genomic hybridization in 124 meningiomas: correlation with clinical, histopathologic, and prognostic features. *Am J Clin Pathol* 2005;123;744-51.
124. Lu Z, Lam K, Wang N, Xu X, Cortes M, Andersen B. LMO4 can interact with Smad proteins and modulate transforming growth factor-beta signaling in epithelial cells. *Oncogene* 2006;25;2920-30.
125. Katoh Y, Katoh M. Identification and characterization of CDC50A, CDC50B and CDC50C genes in silico. *Oncol Rep* 2004;12;939-43.
126. Rifkin DB. Latent transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding proteins: orchestrators of TGF-beta availability. *J Biol Chem* 2005;280;7409-12.
127. Taipale J, Saharinen J, Keski-Oja J. Extracellular matrix-associated transforming growth factor-beta: role in cancer cell growth and invasion. *Adv Cancer Res* 1998;75;87-134.
128. Vehviläinen P, Hyytiäinen M, Keski-Oja J. Latent transforming growth factor-beta-binding protein 2 is an adhesion protein for melanoma cells. *J Biol Chem* 2003;278;24705-13.
129. Cicha I, Goppelt-Struebe M. Connective tissue growth factor: context-dependent functions and mechanisms of regulation. *Biofactors*;35;200-8.

130. Fan Y, Nikitina T, Zhao J, Fleury T, Bhattacharyya R, Bouhassira E, Stein A, Woodcock C, Skoultchi A. Histone H1 depletion in mammals alters global chromatin structure but causes specific changes in gene regulation. *Cell* 2005;123;1199-212.
131. Urbanowicz-Kachnowicz I, Baghdassarian N, Nakache C, Gracia D, Mekki Y, Bryon PA, Ffrench M. cks2s expression is linked to cell proliferation in normal and malignant human lymphoid cells. *Int J Cancer* 1999;82;98-104.
132. Rother K, Dengl M, Lorenz J, Tschöp K, Kirschner R, Mössner J, Engeland K. Gene expression of cyclin-dependent kinase subunit Cks2 is repressed by the tumor suppressor p53 but not by the related proteins p63 or p73. *FEBS Lett* 2007;581;1166-72.
133. Pines J. Cell cycle: reaching for a role for the Cks proteins. *Curr Biol* 1996;6;1399-402.
134. Kang MA, Kim JT, Kim JH, Kim SY, Kim YH, Yeom YI, Lee Y, Lee HG. Upregulation of the cyclin kinase subunit CKS2 increases cell proliferation rate in gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009;135;761-9.
135. Yu J, Tao Q, Cheung KF, Jin H, Poon FF, Wang X, Li H, Cheng YY, Röcken C, Ebert MP, Chan AT, Sung JJ. Epigenetic identification of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 as a functional tumor suppressor and biomarker for hepatocellular carcinoma and other digestive tumors. *Hepatology* 2008;48;508-18.
136. Sacco JJ, Coulson JM, Clague MJ, Urbé S. Emerging roles of deubiquitinases in cancer-associated pathways. *IUBMB Life* 2010;62;140-57.
137. Fukutomi S, Seki N, Koda K, Miyazaki M. Identification of methylation-silenced genes in colorectal cancer cell lines: genomic screening using oligonucleotide arrays. *Scand J Gastroenterol* 2007;42;1486-94.
138. Ummanni R, Jost E, Braig M, Lohmann F, Mundt F, Barrett C, Schlomm T, Sauter G, Senff T, Bokemeyer C, Sültmann H, Meyer-Schwesinger C, Brümmendorf TH, Balabanov S. Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 1 (UCHL1) is a potential tumour suppressor in prostate cancer and is frequently silenced by promoter methylation. *Mol Cancer* 2011;10;129.
139. Sato F, Meltzer SJ. CpG island hypermethylation in progression of esophageal and gastric cancer. *Cancer* 2006;106;483-93.
140. Katoh M. WNT signaling pathway and stem cell signaling network. *Clin Cancer Res* 2007;13;4042-5.
141. Götze S, Wolter M, Reifenberger G, Müller O, Sievers S. Frequent promoter hypermethylation of Wnt pathway inhibitor genes in malignant astrocytic gliomas. *Int J Cancer* 2009.

142. Chung M, Lai H, Sytwu H, Yan M, Shih Y, Chang C, Yu M, Liu H, Chu D, Lin Y. SFRP1 and SFRP2 suppress the transformation and invasion abilities of cervical cancer cells through Wnt signal pathway. *Gynecol Oncol* 2009;112:646-53.
143. Caldwell G, Jones C, Gensberg K, Jan S, Hardy R, Byrd P, Chughtai S, Wallis Y, Matthews G, Morton D. The Wnt antagonist sFRP1 in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 2004;64:883-8.

Anexo

I. ARTÍCULO 1

Differential expression profiling analyses identifies downregulation of 1p, 6q and 14q genes and overexpression of 6p histone cluster 1 genes as markers of recurrence in meningiomas

Elisa Pérez-Magán, Ángel Rodríguez de Lope, Teresa Ribalta, Yolanda Ruano, Yolanda Campos-Martín, Gerardo Pérez-Bautista, Juan Fernando García, Ainoha García-Claver, Concepción Fiaño, José-Luís Hernández-Moneo, Manuela Mollejo, Bárbara Meléndez.

Neuro Oncology. 12(12):1278-90. 2010.

Differential expression profiling analyses identifies downregulation of 1p, 6q, and 14q genes and overexpression of 6p histone cluster 1 genes as markers of recurrence in meningiomas

Elisa Pérez-Magán, Ángel Rodríguez de Lope, Teresa Ribalta, Yolanda Ruano, Yolanda Campos-Martín, Gerardo Pérez-Bautista, Juan Fernando García, Ainoha García-Claver, Concepción Fiaño, José-Luis Hernández-Moneo, Manuela Mollejo, and Bárbara Meléndez

Molecular Pathology Research Unit (E.P.-M., Y.R., Y.C.-R., A.G.-C., M.M., B.M.), Department of Neurosurgery (A.R.L., J.-L.H.-M.), Department of Pathology (G.P.-B., M.M.), Virgen de la Salud Hospital, Toledo 45004, Spain; Department of Pathology, Clinic Hospital, Barcelona 08036, Spain (T.R.); Department of Pathology, MD Anderson Internacional, Madrid 28033, Spain (J.F.G.); Department of Pathology, Xeral-Cíes Hospital Complex, Vigo 36204, Spain (C.F.)

The majority of meningiomas are probably benign but a number of tumors display considerable histological and/or clinical aggressivity, sometimes with unexpectedly high recurrence rates after radical removal. Understanding the potential behavior of these tumors in individual patients is critical for rational therapeutic decision-making. This study aimed to identify gene expression profiles and candidate markers associated with original and recurrent meningiomas. Unsupervised hierarchical clustering of the samples confirmed 2 main groups of meningiomas with distinct clinical behaviors. The gene expression profiling study identified genes and pathways potentially associated with meningioma recurrence, revealing an overall lower level of gene expression. The differential gene expression profiling analyses of original and recurrent meningiomas identified 425 known genes and expressed sequence tags related to meningioma recurrence, with *SFRP1* (8p12), *TMEM30B* (14q23), and *CTGF* (6q23) showing the most disparate expression. Most of the differentially expressed genes were located at 1p, 6q, and 14q and were underexpressed in recurrences.

Loss of such chromosomal regions has previously been associated with a higher risk of meningioma recurrence or malignant progression. Thus, at these locations, we propose the existence of novel candidate genes that could be involved in meningioma recurrence. In addition, the overexpression of genes of histone cluster 1 (6p) in recurrent meningiomas is reported here for the first time. Finally, the altered genes related to meningioma recurrence are involved in pathways such as Notch, TGF β , and Wnt, as described previously, and in other pathways such as cell cycle, oxidative phosphorylation, PPAR, and PDGF, not related before to meningioma recurrence.

Keywords: meningioma, recurrence, expression profiling, candidate genes.

Meningiomas are the most common primary brain tumors, accounting for over 34% of all tumors and having an incidence of 6.17 per 100 000 person-years, as reported in a recent population-based study.¹ Many small meningiomas go unnoticed during life and are found incidentally in up to 1.4% of people in autopsy series.²

The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the nervous system distinguishes between grade I (benign), grade II (atypical), and grade

Received February 3, 2009; accepted June 21, 2010.

Corresponding Author: Bárbara Meléndez, PhD, Molecular Pathology Research Unit, Virgen de la Salud Hospital, Avda. Barber 30, 45004 Toledo, Spain (bmelendez@sescam.jccm.es).

II. ARTÍCULO 2

Genetic alterations associated with progression and recurrence in meningiomas

Elisa Pérez-Magán, Yolanda Campos-Martín, Pilar Mur, Concepción Fiaño, Teresa Ribalta, Juan Fernando García, Juan Rey, Angel Rodríguez de Lope, Manuela Mollejo, Bárbara Meléndez.

Journal of Neuropathology and Experimental Neurology. **Aceptado Julio 2012.**

