

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



TESIS DOCTORAL

Análisis e identificación de marcadores genéticos y epigenéticos en gliomas.

Factores de diagnóstico, pronóstico y predictivo

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Pilar Mur Molina

Directoras

Bárbara Meléndez Asensio
Manuela Mollejo Villanueva

Madrid, 2015



**ANÁLISIS E IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS Y
EPIGENÉTICOS EN GLIOMAS.
FACTORES DE DIAGNÓSTICO, PRONÓSTICO Y PREDICTIVOS**

Tesis adscrita a:

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Dpto. de BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I

**Programa de doctorado en
Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina**

Doctorando:

Pilar Mur Molina

Directores:

Bárbara Meléndez Asensio

Manuela Mollejo Villanueva

Tutora:

Cristina Sánchez García

PILAR MUR MOLINA

Toledo, 2014

A mi padre, mi gran ejemplo a seguir. Siempre presente

A mi familia, por su apoyo incondicional

Por y para ellos.

“El camino es el que nos enseña la mejor forma de llegar...

...y nos enriquece mientras lo estamos cruzando.”

Paulo Coelho

ABREVIATURAS

As	Astrocitoma	DNMTs	ADN metiltransferasas
AA	Astrocitoma anaplásico	DRAM1	Del inglés, <i>DNA-damage Regulated Autophagy Modulator 1</i>
AD	Astrocitoma difuso	DRG2	Del inglés, <i>Developmentally Regulated GTP binding protein 2</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico	DS	Desviación estándar
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario	EGFR	Del inglés, <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ALT	Del inglés, <i>Alternative Lengthening of Telomeres</i>	ENC1	Del inglés, <i>Ectodermal-Neural Cortex 1</i>
ARN	Ácido ribonucleico	EORTC	Del inglés, <i>European Organization for Research and Treatment of Cancer</i>
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero	FBXO42	Del inglés, <i>F-box protein 42</i>
ATRX	Del inglés, <i>Alpha Thalassemia/mental Retardation Syndrome X-linked</i>	FC	Del inglés, <i>Fold change</i>
BSA	Del inglés, <i>Bisulfite Sequencing Analysis</i>	FDR	Del inglés, <i>False Discovery Rate</i>
BAC	Del inglés, <i>Bacterial Artificial Chromosome</i>	FISH	Del inglés, <i>Fluorescence "in situ" hybridization</i>
BTCG	Del inglés, <i>Brain Tumor Study Group</i>	FNBP1L	Del inglés, <i>Formin Binding Protein 1-like</i>
CBTRUS	Del inglés, <i>Central Brain Tumor Registry of the United States</i>	FUBP1	Del inglés, <i>Far Upstream Element (FUSE) Binding Protein 1</i>
CIC	Del inglés, <i>Capicua transcriptional repressor</i>	GAPDH	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
CIMP	Del inglés, <i>CpG Island Methylator Phenotype</i>	GBM	Glioblastoma multiforme
CN	Cerebro normal	GDE	Genes diferencialmente expresados
DAVID	Del inglés, <i>Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i>	GDM	Genes diferencialmente metilados
DAXX	Del inglés, <i>Death-domain associated protein</i>	GDNF	Del inglés, <i>Glial Cell Derived Neurotrophic Factor</i>
DLEU7	Del inglés, <i>Deleted in lymphocytic leukemia, 7</i>	GEO	Del inglés, <i>Gene Expression Omnibus</i>
DNMAD	Del inglés, <i>Diagnosis and Normalization of Microarray Data</i>	GUSB	Del inglés, <i>Glucuronidase, beta</i>
		HAT	Histonas Acetil-transferasas

HDAC	Histonas Deacetilasas	OMS	Organización Mundial de la Salud
HDM	Histonas Demetilasas	PanNETs	Del inglés, <i>Pancreatic neuroendocrine tumors</i>
2-HG	2-hidroxiglutarato	PBS	Del inglés, <i>Phosphate buffered saline</i>
HIST1H1A	Del inglés, <i>Histone cluster 1, H1a</i>	PCV	Del inglés, <i>Procarbazina-Vincristina-Lomustina</i>
HM450K	Del inglés, <i>Human methylation 450K</i>	PNA	Del inglés, <i>Peptide nucleic acid</i>
5-hmc	5-metilcitosina Hidroxilasa	PTPRF	Del inglés, <i>Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor Type, F</i>
HMT	Histona Metiltransferasa	qMSP	Del inglés, <i>quantitative Methylation-Specific PCR</i>
HPRT1	Del inglés, <i>Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1</i>	QT	Quimioterapia
HRM	Del inglés, <i>High Resolution Melting</i>	qRT-PCR	Del inglés, <i>quantitative Reverse Transcriptase PCR</i>
IDH	Del inglés, <i>Isocitrate dehydrogenase</i>	RT	Radioterapia
IHQ	Inmunohistoquímica	RIOK2	Del inglés, <i>RIO kinase 2</i>
α-KG	α-cetoglutarato	SAM	S-Adenosil metionina
KIAA0495	Del inglés, <i>TP73 antisense RNA 1</i>	SG	Supervivencia global
MGMT	Del inglés, <i>O-6-methylguanine-DNA methyltransferase</i>	SLP	Supervivencia libre de progresión
MOXD1	Del inglés, <i>Monoxygenase, DBH-like 1</i>	SNC	Sistema Nervioso Central
MSI	Del inglés, <i>Microsatellite instability</i>	TCGA	Del inglés, <i>The Cancer Genome Atlas</i>
MSP	Del inglés, <i>Methylation-Specific PCR</i>	TERT	Del inglés, <i>Telomerase Reverse Transcriptase</i>
MTIC	Del inglés, <i>Monometil-Triazenoimidazol-Carboxamida</i>	TMA	Del inglés, <i>Tissue Microarrayer</i>
NCCN	Del inglés, <i>National Comprehensive Cancer Network</i>	TMZ	Temozolamida
NCIC	Del inglés, <i>National Cancer Institut of Canada</i>	TO	Tumores Oligodendrogiales
OD	Oligodendroglioma	TP53	Del inglés, <i>Tumor Protein p53</i>
ODA	Oligodendroglioma anaplásico	TSS	Del inglés, <i>Transcriptional Start Site</i>
OA	Oligoastrocitoma	TSG101	Del inglés, <i>Tumor Susceptibility Gene 101</i>
OAA	Oligoastrocitoma anaplásico	TRIP4	Del inglés, <i>Thyroid Hormone Receptor Interactor 4</i>

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS	5
RESUMEN	17
INTRODUCCIÓN	23
1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LOS TUMORES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	23
1.1. Epidemiología y aspectos generales.....	23
1.2. Clasificación y diagnóstico histopatológico de los tumores gliales	25
1.3. Aspectos generales del tratamiento actual	28
1.4. Factores clínicos de pronóstico en gliomas	30
2. GENÉTICA DE LOS GLIOMAS.....	31
2.1. Mutación de los genes IDH1/IDH2 como evento temprano en la gliomagénesis	31
2.2. Alteraciones moleculares en tumores oligodendrogiales	33
2.3. Alteraciones moleculares en tumores de diferenciación astrocitaria	34
2.4. Subtipos moleculares en función de su perfil de expresión génica.....	36
2.5. Mutaciones en genes remodeladores de la cromatina	37
3. EPIGÉNÉTICA.....	38
3.1. Metilación en cáncer	39
3.2. Metilación en gliomas	40
3.3. Modificación de histonas.....	45
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	49
MATERIAL Y MÉTODOS.....	53
4. RECOGIDA DE MUESTRAS Y SELECCIÓN DE PACIENTES	53
5. METODOLOGÍA.....	54
5.1. Extracción de ácidos nucleicos y cuantificación	54

5.2.	Identificación de mutaciones somáticas en los genes <i>TP53</i> e <i>IDH1/2</i>	54
5.3.	Hibridación “in situ” fluorescente (FISH).....	56
5.4.	Estudio del perfil de metilación en el genoma completo.....	60
5.5.	Estudio de la metilación del gen <i>MGMT</i> (O-6-metilguanina ADN metiltransferasa)	64
5.6.	Análisis de la expresión génica	67
5.7.	Análisis de expresión proteica mediante técnicas inmunohistoquímicas	69
5.8.	Validación de los resultados utilizando bases de datos externas.....	71
5.9.	Análisis estadísticos y funcionales	72
RESULTADOS		75
6.	CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LA SERIE.....	75
7.	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS GLIOMAS	75
7.1.	Mutación de <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i>	75
7.2.	Pérdida combinada de 1p/19q y translocación t(1;19)(q10;p10)	77
7.3.	Expresión de la proteína ATRX	79
7.4.	Mutación de <i>TP53</i> y expresión de la proteína p53.....	81
7.5.	Resumen de las alteraciones moleculares analizadas	83
7.6.	Clasificación molecular basada en el estado mutacional de <i>IDH</i> , codeleción de 1p/19q y expresión de ATRX.....	83
8.	FACTORES CON VALOR PRONÓSTICO.....	85
8.1.	Análisis del valor pronóstico de los factores clínico-patológicos	85
8.2.	Análisis del valor pronóstico de los marcadores moleculares analizados.....	86
8.3.	Estudio del valor pronóstico de la clasificación molecular basada en el estado de mutacional de <i>IDH</i> , codeleción de 1p/19q y la expresión de ATRX.....	87
9.	PERFILES DE METILACIÓN EN TUMORES OLIGODENDROGLIALES (TO)	88
9.1.	Comparación de los perfiles de metilación de los TO con cerebro normal.....	88
9.2.	Perfiles de metilación asociados al estado mutacional del gen <i>IDH</i>	91
9.3.	Perfiles de metilación asociados a la pérdida de 1p/19q	93
9.4.	Relación entre los perfiles de metilación y los parámetros moleculares y clínicos.....	95

9.5. Validación mediante bases de datos externas	97
9.6. Caracterización de los patrones de metilación identificados en TOs	99
9.7. Localización y distribución de la metilación diferencial entre cada grupo CIMP y el CN	100
9.8. Identificación de los genes diferencialmente metilados entre tumores CD-CIMP+ y CIMP+ .	102
9.9. Validación de los perfiles de metilación y de genes candidatos	104
10. PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA EN TUMORES OLIGODENDROGLIALES	108
10.1. Perfiles de expresión asociados al estado mutacional de <i>IDH</i> y a la pérdida de 1p/19q	108
10.2. Perfiles de expresión asociados a los distintos perfiles de metilación CIMP	111
10.3. Correlación entre la expresión y los perfiles de metilación en TO	113
10.4. Validación de los perfiles de expresión génica en TO	114
11. ESTUDIO DE LA METILACIÓN DEL GEN <i>MGMT</i> EN GLIOMAS.....	117
11.1. Distribución de la metilación de los sitios CpG de <i>MGMT</i> y su relación con supervivencia....	117
11.2. Asociación del estado de metilación de <i>MGMT</i> con el perfil G-CIMP y factores clínicos e histopatológicos	120
11.3. Validación de la pérdida de valor pronóstico de la CpG 25 en pacientes con tumores G-CIMP- o <i>IDH</i> wt.....	123
11.4. Impacto clínico de la metilación del promotor de <i>MGMT</i> en pacientes con GBM tratados homogéneamente	125
DISCUSIÓN	129
CONCLUSIONES	145
REFERENCIAS.....	149
ANEXO	161

ABSTRACT / RESUMEN

ABSTRACT

Gliomas are the most common primary brain tumors, accounting for 80% of malignant brain tumors with a heterogeneous clinical and biological behavior. Currently, the diagnosis of these tumors is based on histopathologic criteria established by the World Health Organization (WHO), classified according to their morphology in oligodendrogliomas, oligoastrocytomas and astrocytomas, and to their aggressiveness, in 4 malignancy grades (I to IV). However, sometimes the histopathological classification of gliomas, particularly in mixed tumors, can be difficult because their morphological interpretation is subject to variation between different observers. Therefore, the identification of distinct molecular alterations in these tumors could contribute to the improvement of the histological diagnosis and provide prognostic information for patients and assessment of the treatment of patients with gliomas.

The aim of this work was to study different genetic and epigenetic factors, trying to correlate with histopathologic and clinical features to identify potential biomarkers that may be useful for diagnosis, prognosis and treatment of the patients with gliomas.

In this study we characterized at the molecular level 272 gliomas with different histology and grades, analyzing alterations in the *IDH* gene and the expression of ATRX and p53 proteins, as well as the combined 1p/19q loss. The analysis of these molecular alterations confirmed the diagnostic value of the *IDH* gene mutation, detecting higher frequencies in diffuse gliomas of grade II and III (61.5-83%) and being absent in GBM (1.6%). Similarly, the 1p/19q codeletion was exclusive from the oligodendroglial tumors, which mostly also had *IDH* mutation (97.9%), while the absence of ATRX protein expression and overexpression of p53 were predominantly observed in astrocytic tumors. Furthermore, we studied the prognostic value of these alterations detecting an increased survival in patients with *IDH* mutation (15 vs. 1.5 years), 1p/19q codeletion (13.5 vs. 7.5 years) and absence of ATRX expression (9.3 vs. 3.9 years) protein. The combination of these molecular alterations allowed us to classify gliomas, defining four distinct molecular subtypes associated with the clinical outcome of patients. The "I-CD" tumors (*IDH* mutated, 1p/19q codeleted and ATRX expression) had a better prognosis (179.5 months; 15 years) than the "IA tumors" (*IDH* mutated, ATRX/p53 altered and 1p/19q intact) who survived 117 months (10 years), and the "I" tumors (*IDH* mutated tumors with 1p/19q intact and ATRX expression) that had a worse prognosis than the previous groups despite having *IDH* mutated (82.7 months, 7 years). Finally, tumors without any of these alterations "NA tumors" had a very poor prognosis (< 1year).

The study of epigenetic alterations in oligodendroglial tumors was performed by means of characterization of the whole-genome methylation levels in a series of 46 oligodendroglial tumors, including both pure and mixed tumors, with high and low grade, to compare with non-tumoral samples.

The identified epigenetic alterations were correlated with the expression levels of 25 oligodendroglial tumors and compared with normal brain tissue samples. The study of the whole genome methylation identified that the CpG island methylator phenotype (G-CIMP+) previously described actually comprised two different CIMP profiles of important clinical relevance. Two new methylation patterns were identified, both associated with *IDH* mutation although with different molecular, histopathological and prognostic features. The first profile (CD-CIMP+) included tumors with 1p/19q loss, mostly pure oligodendrogliomas with a better prognosis. The other CIMP+ profile was observed in mixed tumors with TP53 gene mutation, absence of ATRX expression, 1p/19q intact and worse clinical behavior. Finally, gliomas without hypermethylator profile (CIMP-) showed none of the studied alterations, and were mostly tumors with astrocytic component and a worse prognosis. The correlation of these groups of tumors with specific expression profiles were also observed, indicating the impact of genetic status (*IDH* mutation, 1p/19q codeletion, TP53 mutation, ATRX protein expression) on gene expression, and identifying candidate biomarkers that can become selective therapeutic targets.

Methylation data from these oligodendroglial tumors were extended using external data to include a total of 247 glioma samples. These data were used to study in detail the methylation of the promoter and body of the *MGMT* gene and its prognostic value. This analysis showed two CpGs strongly associated with survival, within the promoter (CpG 25 cg12981137) and another within the gene body (CpG 165, cg07933035), both strongly correlated with the G-CIMP+ state. These results were validated in an independent series of anaplastic gliomas from the EORTC-26951 trial. The prognostic value of promoter methylation of *MGMT* (CpG25) was not observed in patients with tumors G-CIMP-. These results were confirmed in different series and using different techniques. Interestingly, in contrast to the *MGMT* promoter, gene body methylation was of prognostic value in G-CIMP- patients older than 65 years (391 vs. 224 days).

The results obtained in this study show that certain combinations of molecular genetic alterations could determine the genesis and tumor progression of gliomas. *IDH* mutations as the first event in tumor development and post cumulative alterations: ATRX/TP53 in astrocytomas or the combined 1p/19q loss in oligodendrogliomas. These alterations correlate with the different methylation profiles identified and determine different prognostic in each molecular subtype. Our results, therefore, could facilitate a more objective classification of patients based on the molecular alterations present in their tumors, and may help to determine the type of therapy most appropriate to each of them.

RESUMEN

Los gliomas son las neoplasias cerebrales primarias más frecuentes, suponiendo casi el 80% de los tumores cerebrales malignos, con un comportamiento clínico y biológico heterogéneo. Actualmente, el diagnóstico de estos tumores se basa exclusivamente en los criterios histopatológicos establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS), clasificándose según su morfología en oligodendrogliomas, oligoastrocitomas y astrocitomas, y según su agresividad, en 4 grados de malignidad (I al IV). A pesar de ello, en ocasiones la clasificación histológica de los gliomas, en particular la de los tumores mixtos, puede ser difícil debido a que su interpretación morfológica está sujeta a la variación entre los distintos observadores. Por ello, la identificación de distintas alteraciones moleculares en estos tumores podría contribuir en la mejora del diagnóstico histológico, así como aportar información sobre el pronóstico de los pacientes e incluso optimizar los tratamientos para ofrecer una terapia personalizada.

El objetivo de este trabajo consistió en estudiar diferentes factores genéticos y epigenéticos, tratando de correlacionarlos con características histopatológicas y clínicas, para dar lugar a la identificación de posibles biomarcadores que puedan ser útiles para el diagnóstico, establecimiento del pronóstico y tratamiento de los pacientes con gliomas.

En este trabajo se caracterizaron a nivel molecular 272 gliomas de histologías y grados distintos, analizando alteraciones en el gen *IDH* y en la expresión de las proteínas ATRX y p53, así como la pérdida combinada de 1p/19q. El estudio de estas alteraciones moleculares confirmó el valor diagnóstico de la mutación en el gen *IDH*, detectando elevadas frecuencias en gliomas difusos de grado II y III (61,5-83%) y estando prácticamente ausente en GBM (1,6%). De la misma manera, la codeleción de 1p/19q era exclusiva de tumores oligodendrogliales, los cuales en su mayoría también presentaban la mutación del gen *IDH* (97,9%), mientras que la ausencia de expresión de la proteína ATRX y la sobreexpresión de p53 se observaron mayoritariamente en tumores astrocitarios. Por otro lado, se estudió el valor pronóstico de estas alteraciones, observando una mayor supervivencia en los casos con mutación de *IDH* (15 vs. 1,5 años), codeleción de 1p/19q (13,5 vs. 7,5 años) y ausencia de expresión de la proteína ATRX (9,3 vs. 3,9 años). La combinación de estas alteraciones moleculares nos permitió realizar una clasificación de los gliomas, definiendo cuatro subtipos moleculares distintos asociados a una evolución clínica de los pacientes concreta. Los tumores "I-CD" (*IDH* mutado, 1p/19q codelecionado y expresión de ATRX) tuvieron un mejor pronóstico (179,5 meses; 15 años) que los "tumores IA" (*IDH* mutado, ATRX y p53 alterado y 1p/19q intacto) que presentaban un pronóstico intermedio (117 meses; 10 años), y que los tumores "I" (*IDH* mutado, expresión de ATRX y 1p/19q intacto) con peor pronóstico a pesar de presentar también la mutación en el gen *IDH* (82,7 meses; 7 años). Finalmente, los tumores sin ninguna de estas alteraciones estudiadas "tumores SA" vivían menos de un año.

El estudio de las alteraciones en los mecanismos epigenéticos en tumores oligodendrogiales se realizó mediante la caracterización de los niveles de metilación global del genoma en una serie de 46 tumores oligodendrogiales, incluyendo tanto tumores puros como oligodendrogliomas mixtos, así como de alto y bajo grado, para compararlos con los de muestras no tumorales. Las alteraciones epigenéticas identificadas se correlacionaron con los niveles de expresión de 25 tumores oligodendrogiales y se compararon con muestras de tejido no tumoral. El estudio de la metilación global del genoma identificó que el fenotipo hipermetilador (G-CIMP+) previamente descrito comprendía en realidad dos perfiles CIMP distintos de relevancia clínica importante. Se identificaron dos nuevos patrones de metilación, ambos asociados a la mutación de *IDH* pero con características moleculares, histopatológicas y pronósticas distintas. El primer perfil (CD-CIMP+), abarcaba los tumores con pérdida de 1p/19q, mayoritariamente oligodendrogliomas puros y con un mejor pronóstico. El otro perfil CIMP+, se observó en tumores mixtos con mutación en el gen *TP53* y ausencia de expresión de *ATRX*, sin pérdida de 1p/19q y un peor comportamiento clínico que el anterior. Por último, los gliomas que no tenían un perfil hipermetilador (CIMP-) no presentaron ninguna de las alteraciones estudiadas, siendo mayoritariamente tumores con un componente astrocitario y de peor pronóstico. También, se observó la correlación de estos grupos de tumores con perfiles de expresión específicos, lo que indicaba el impacto del estado genético (mutación de *IDH*, codeleción 1p/19q, mutación en *TP53*, expresión de la proteína *ATRX*) sobre la expresión génica, permitiendo identificar biomarcadores candidatos que pueden convertirse en dianas terapéuticas selectivas.

Los datos de metilación obtenidos de los 46 tumores oligodendrogiales, junto con los obtenidos de 201 gliomas depositados en bases públicas, se utilizaron para estudiar en detalle la metilación en el promotor y el cuerpo del gen *MGMT* y su valor pronóstico. Este análisis mostró dos CpGs fuertemente asociadas con supervivencia, una dentro del promotor (CpG 25, cg12981137) y otra dentro del cuerpo del gen (CpG 165, cg07933035), ambas fuertemente correlacionadas con el estado G-CIMP+. Estos resultados se validaron en una serie independiente de gliomas anaplásicos pertenecientes al ensayo clínico EORTC-26951. El valor pronóstico de la metilación en el promotor de *MGMT* (CpG25) no se observó en pacientes con tumores G-CIMP-. Estos resultados se confirmaron en diversas series y mediante el uso de distintas técnicas. Curiosamente, a diferencia de lo que ocurrió con la relevancia clínica del promotor de *MGMT* en casos G-CIMP-, la metilación en el cuerpo de *MGMT* (CpG165) sí tuvo valor pronóstico en estos casos, detectándose una mayor supervivencia en los que tenían *MGMT* metilado (391 vs. 224 días), aunque únicamente en los pacientes mayores de 65 años.

Los resultados obtenidos en este trabajo sobre la caracterización molecular de los gliomas demuestran que en estos tumores se producen determinadas combinaciones de alteraciones genéticas

que determinan la génesis y evolución tumoral. Mutaciones en *IDH*, como primer evento en el desarrollo tumoral y posteriores alteraciones acumuladas: *ATRX/TP53* en astrocitomas o la pérdida combinada de 1p/19q en oligodendrogliomas. Estas alteraciones correlacionan con los distintos perfiles de metilación identificados, y determinan pronósticos específicos en cada subtipo molecular. Nuestros resultados, por tanto, podrían contribuir a una clasificación de los pacientes en función de las alteraciones moleculares que presente su tumor para poder determinar así el tipo de terapia más adecuada a cada uno de ellos.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LOS TUMORES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

1.1. Epidemiología y aspectos generales

Los tumores primarios del Sistema Nervioso Central (SNC) constituyen alrededor del 3% del total de las neoplasias del adulto y son responsables del 2,4% de las muertes por cáncer. La tasa de incidencia de los tumores cerebrales según estudios epidemiológicos de Estados Unidos (Central Brain Tumor Registry of the United States; CBTRUS) (1) es de 20 casos por cada 100.000 habitantes/año. La incidencia en niños (0-19 años) es de 5 casos, mientras en adultos (mayores de 20 años) es de 27 casos por cada 100.000 habitantes/año. En España se diagnostican 4.000 casos nuevos al año y se estima una incidencia de 8,73 en varones y de 5,41 en mujeres (1). En la infancia, se encuentra un pico de incidencia en los niños de entre 5 a 14 años, donde representan entre el 19-20% de todos los cánceres; mientras que en los adultos, la mayor incidencia se sitúa por encima de los 50 años (edad media en los 56 años). De todas formas, la distribución por edad es variable y depende de la localización tumoral y la histología (2).

A pesar de esta relativa baja incidencia, los tumores cerebrales primarios suponen un importante problema de salud, ya que son enfermedades de mal pronóstico vital y que provocan un marcado deterioro funcional. Es por todo ello que es necesario tratar de mejorar la calidad de vida de estos pacientes, optimizando su diagnóstico y tratamiento con el objetivo de aumentar su tasa de curación.

La localización de estos tumores es variable, aunque el sitio más común donde se encuentran es en las meninges (35%). El 22% de los tumores se localiza en el lóbulo frontal, temporal, parietal y occipital del cerebro mientras que los tumores situados en cerebro, ventrículo, cerebelo o tronco encefálico representan un 7,5%. En los nervios craneales y la médula espinal se encuentra el 10% de todos los tumores (7% y 3%, respectivamente). La pituitaria y la glándula pineal representan alrededor del 16% de los tumores (1) (Figura 1).

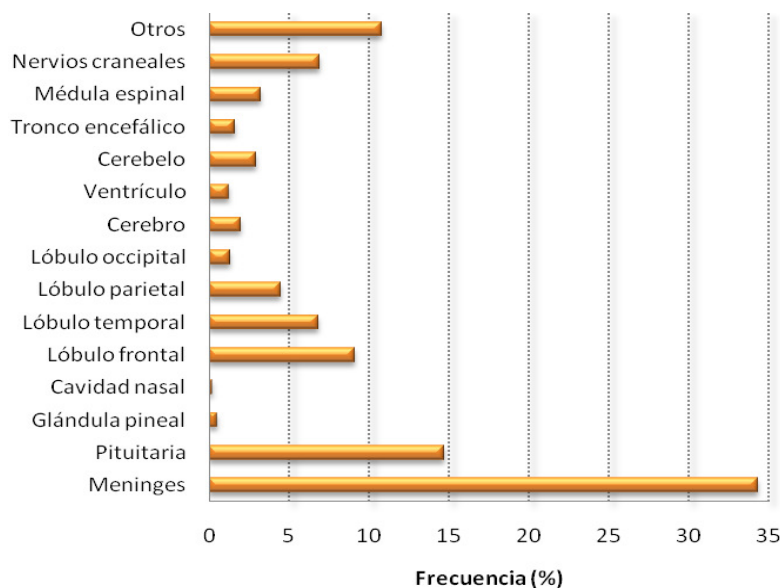


Figura 1. Distribución de los tumores cerebrales primarios y del SNC por localización (N=311.202). Datos de CBTRUS.

Por otro lado, la distribución histológica de los tumores cerebrales se muestra en la Tabla 1, donde se observa que predominan los meningiomas (tumores benignos) representado un 35,5% de todos los tumores, seguidos de los gliomas (25,9%) (1).

Tabla 1. Distribución por subtipos histológicos de los tumores cerebrales y del SNC basándose en CBTRUS 2012

	Histología	Frecuencia (%)
GLIOMAS	Glioblastoma	15,8
	Astrocitomas	6,3
	Tumores ependimales	2
	Oligodendrogliomas	1,8
	Meningioma	35,5
	Tumores hipofisarios	14,1
	Tumores embrionales	1,2
	Craneofaringioma	0,9
	Limfoma cerebral primario	2,2
	Tumores de las vainas nerviosas	8,3
	Tumores de células germinales	0,5
	Otros	11,4

1.2. Clasificación y diagnóstico histopatológico de los tumores gliales

El diagnóstico histopatológico de los tumores del SNC se basa en el sistema de clasificación y gradación establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y es fundamental para establecer el pronóstico y el tratamiento de estos tumores (3). Esta clasificación combina la célula tumoral de la que se originan, el grado histológico del tumor y su capacidad infiltrante, sin incluir las alteraciones moleculares características de cada subtipo.

Los gliomas representan el 80% de los tumores primarios malignos (1) y se definen como tumores que se originan de células gliales. Aproximadamente, el 60% de los gliomas se localizan en los lóbulos del cerebro. La distribución histológica de los tumores gliales según la clasificación de la OMS muestra que los astrocitomas (As) son el subtipo mayoritario (76%) siendo el 54% de ellos, glioblastomas (GBM). Los oligodendrogliomas (OD) y oligoastrocitomas (OA) pueden agruparse como tumores oligodendrogliales y representan un 9,7% de los gliomas (Figura 2).

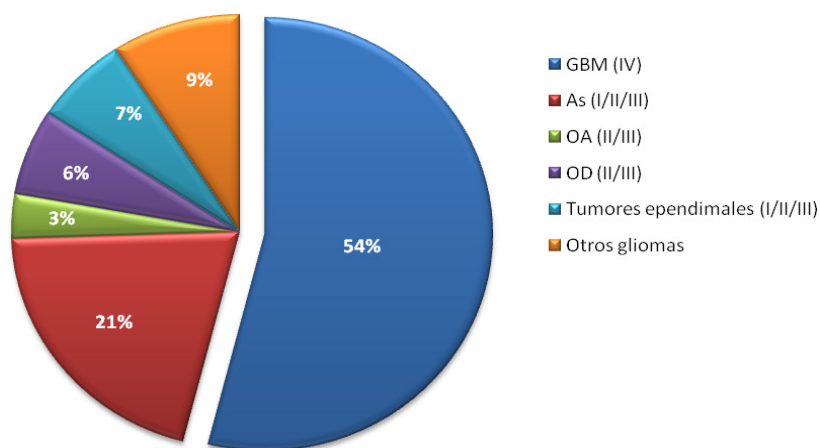


Figura 2. Distribución por subtipos de los gliomas según el estudio de CBTRUS 2012 (N=311.202).

Por otro lado, cuatro grados histológicos permiten predecir el comportamiento biológico de estos tumores, definidos según su capacidad infiltrante y características histológicas como la presencia de mitosis, atipia, proliferación vascular y áreas de necrosis (Tabla 2).

Tabla 2. Grados histológicos establecidos por la OMS para los tumores gliales

Grado I	Bajo potencial proliferativo y lesiones localizadas
Grado II	Baja actividad mitótica, atipia nuclear y lesiones infiltrantes
Grado III	Elevada actividad mitótica, atipia nuclear, anaplasia
Grado IV	Elevada actividad mitótica, atipia nuclear, proliferación endotelial y/o necrosis

El presente estudio se centra en los tumores gliales infiltrantes más frecuentes: astrocitoma difuso (grado II), astrocitoma anaplásico (grado III), glioblastoma (grado IV), oligodendrogliomas de grados II y III y mixtos (grados II y III). Estos subtipos se detallan brevemente a continuación:

1.2.1. Tumores astrocitarios difusos

1.2.1.1. Astrocitoma difuso grado II (AD):

El astrocitoma difuso grado II es una lesión bien diferenciada y difusamente infiltrante que representa el 10-15% de todos los tumores cerebrales astrocitarios. Afecta tanto a jóvenes como a adultos de edad media, encontrando un 60% entre 20-45 años. Estos tumores se localizan de manera frecuente supratentorialmente, en lobulos frontal y temporal (3). Histológicamente, el astrocitoma difuso de bajo grado está formado por lesiones con aumento de celularidad, núcleos ovals, escasa atipia y mitosis ausentes. Pueden ser difícilmente diferenciables de astrocitos normales o reactivos (Figura 3) (4). La supervivencia media en estos casos es de 10,5 años.

1.2.1.2. Astrocitoma anaplásico, grado III (AA):

Por otro lado, encontramos tumores astrocitarios difusos e infiltrantes con mayor potencial proliferativo y que muestran anaplasia focal o extensa, clasificados como astrocitomas anaplásicos, grado III. La edad media es de 40-45 años y su localización y sintomatología clínica coinciden con las de los AD grado II. Las características histológicas que lo caracterizan son la mayor densidad celular, claros signos de atipia nuclear y actividad mitótica (3). Este tumor tiene una gran tendencia a progresar a GBM y lo hace en un intervalo medio de dos años. Presenta una supervivencia media de entre 20 y 24 meses (Figura 3) (4, 5).

1.2.1.3. Glioblastoma, grado IV (GBM):

Se trata del tumor cerebral primario más frecuente y de comportamiento altamente agresivo (astrocitoma grado IV). Supone el 60-75% de los tumores astrocitarios y afecta fundamentalmente a adultos entre 45-75 años. Histológicamente se caracteriza por una gran heterogeneidad celular con grados variables de anaplasia así como por presentar necrosis con pseudoempalizada, una actividad

mitótica elevada y proliferación vascular con hiperplasia endotelial (Figura 3). Puede originarse de *novo* (primarios), generalmente en pacientes de edad avanzada, o ser secundarios, cuando progresan desde un tumor astrocitario de menor grado; dándose en pacientes más jóvenes. Los pacientes con GBM tienen una supervivencia media de entre 8 y 14 meses (3).

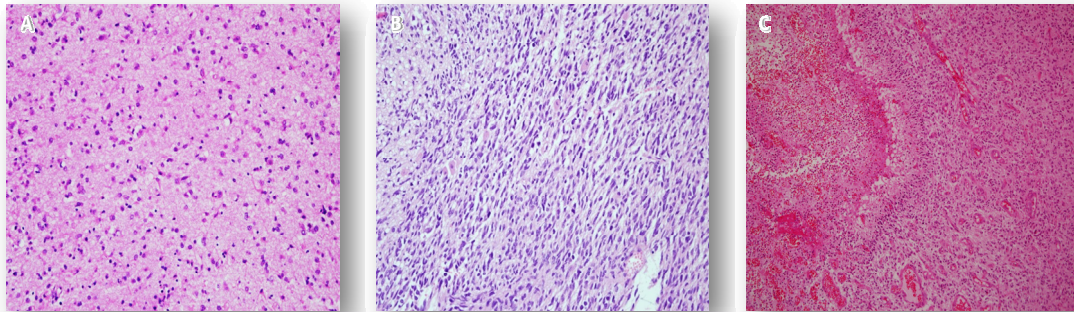


Figura 3. Tumores astrocitarios difusos. **(A)** Astrocitoma difuso grado II **(B)** Astrocitoma anaplásico (grado III) **(C)** Glioblastoma multiforme (grado IV)

1.2.2. Tumores oligodendrogliales

1.2.2.1. Oligodendroglioma grado II (OD):

Constituye el 10-15% de los tumores gliales difusos y puede ocurrir a cualquier edad, aunque es muy infrecuente en niños. La expectativa de vida es de 10-15 años. Histológicamente se caracteriza por estar vascularizado por una rica red capilar fina y ramificada. La población celular tumoral es muy uniforme con núcleos redondos, cromatina fina y un halo claro perinuclear que les confiere un característico aspecto en “huevo frito” (Figura 4) (3-6).

1.2.2.2. Oligodendroglioma anaplásico, grado III (ODA):

Estas neoplasias muestran mayor pleomorfismo, con hiperplasia endotelial, mitosis frecuentes y ocasionalmente focos de necrosis o hemorragia. La esperanza de vida en estos casos es de 3-5 años. A nivel histológico, el diagnóstico diferencial entre oligodendroglioma de alto grado de malignidad y GBM de células pequeñas, en ocasiones, puede resultar difícil (3).

1.2.3. Tumores mixtos

1.2.3.1. Oligoastrocitoma grado II (OA):

Corresponde a un tumor glial difuso que muestra características histológicas mixtas oligodendrogliales y astrocitarias, en áreas geográficas diferenciadas con unos patrones bifásicos o

mezclados. Algunas células muestran características intermedias entre astrocitos y oligodendrocitos. Los pacientes con estos tumores tienen una esperanza de vida de 5-10 años (Figura 4) (3).

1.2.3.2. Oligoastrocitoma anaplásico, grado III (OAA):

Presentan un aumento de la celularidad, mitosis frecuentes e hiperplasia endotelial. Constituyen el 5-10% de los tumores gliales difusos y la mayoría se dan en hemisferios cerebrales. Es también muy infrecuente en niños y tiene una expectativa de vida de 2-4 años. Globalmente, su pronóstico es intermedio entre un astrocitoma y un oligodendroglioma puro. La OMS recomienda que cuando se observa necrosis en este subtipo tumoral debería clasificarse como GBM con componente oligodendroglioma (3).

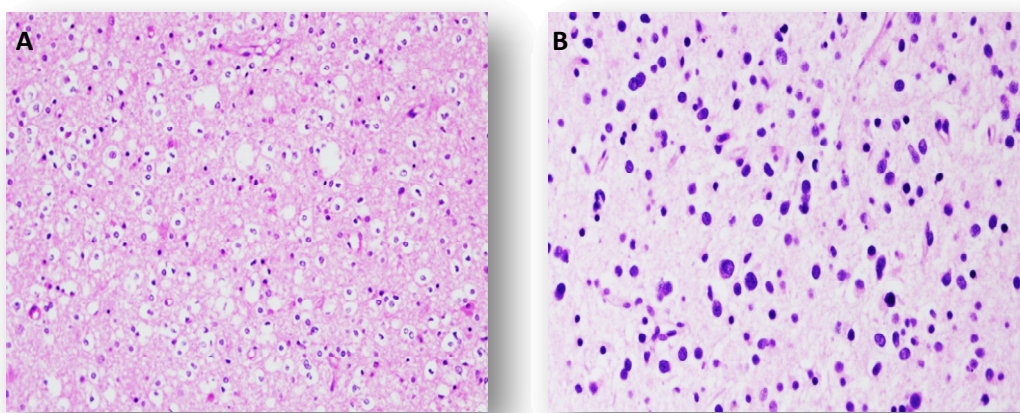


Figura 4. Histología de un (A) oligodendroglioma de grado II y (B) un oligoastrocitoma de grado II.

1.3. Aspectos generales del tratamiento actual

Actualmente, el tratamiento estándar de los gliomas malignos, según la National Comprehensive Cancer Network (NCCN), consiste en cirugía con la máxima resección posible y radioterapia (RT) complementaria. La cirugía resulta fundamental en el manejo de los pacientes con gliomas malignos, permite establecer su diagnóstico y representa el primer acto terapéutico al eliminar masa tumoral. Por otro lado, el tratamiento estándar con radioterapia se basa en la administración de dosis en torno a 60Gy con un fraccionamiento convencional de 200cGy/día en 30 fracciones durante 6 semanas (7).

En gliomas de alto grado, con el objetivo de aumentar la supervivencia de estos pacientes, se combina la **cirugía** y la **RT** con **quimioterapia** (QT) adyuvante.

1.3.1. Tratamiento en GBM

El tratamiento estándar en GBM desde 2005 basado en los estudios de la European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) y la National Cancer Institut of Canada (NCIC) consiste en la

resección quirúrgica seguida de radioterapia con quimioterapia concomitante y adyuvante empleando el agente alquilante temozolamida (8).

La **temozolamida** (TMZ) es un agente alquilante cuyo mecanismo de acción consiste en inhibir la replicación del ADN. Es un fármaco que se transforma espontáneamente en el organismo a su metabolito activo, monometil-triazenoimidazol-carboxamida (MTIC). La activación de este producto conlleva un proceso oxidativo con formación de metildiazonio inestable, que rápidamente se degrada a nitrógeno (N_2) y a un ion carbonio CH_3 que actúa como elemento "alquilante". Este ion carbonio provoca la metilación de algunas bases del ADN (mayoritariamente la guanina). Además, durante el proceso oxidativo que conduce a la activación del fármaco se forman otros radicales libres capaces de provocar la degradación del ADN y la apoptosis en células proliferantes (Figura 5) (9).

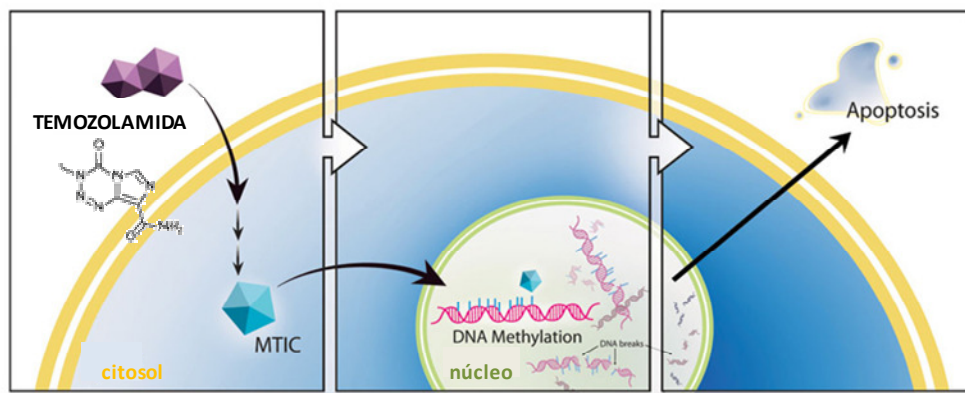


Figura 5. Mecanismo de acción de la temozolamida. Adaptada de (10)

Sin embargo, aunque la introducción de la temozolamida ha mejorado la supervivencia de estos pacientes, el pronóstico sigue siendo malo (supervivencia media de 14,6 meses y una tasa de supervivencia a 2 años del 26,5%) (8). Por ese motivo, están siendo estudiados otros tratamientos como Bevacizumab, un anticuerpo monoclonal contra el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) que ha mostrado una supervivencia libre de progresión a los seis meses del 40-60% en pacientes con GBM recurrentes (11).

1.3.2. Tratamiento en gliomas de grado III

La radioterapia es el tratamiento inicial de referencia en los gliomas de grado III después de una resección quirúrgica. La quimioterapia complementaria estaría indicada en un segundo lugar y en las recidivas. Gracias a distintos ensayos clínicos (NOA-04, RTOG9402, EORTC26951), ha podido establecerse que contrariamente a los GBMs, los tumores de grado III tienen una alta quimio sensibilidad a la combinación de Procarbazina-Vincristina-Lomustina (PCV) (12, 13) así como a la TMZ (14), mostrando resultados similares de supervivencia global y tiempo de progresión en las ramas de RT,

PCV o TMZ (14). Actualmente, se estudia el interés de la radioterapia combinada con quimioterapia en primera línea en el tratamiento de pacientes con estas lesiones (RTOG9813, EORTC/NCI Canada).

1.4. Factores clínicos de pronóstico en gliomas

Los factores de pronóstico son de gran relevancia, ya que aportan información sobre la evolución de un paciente y en ocasiones ayudarán a determinar el tratamiento que se les ofrece.

1.4.1. Relacionados con el paciente

En gliomas la edad es un factor pronóstico independiente, tal y como se ha demostrado en varios análisis multivariantes. En general, el pronóstico es mejor en pacientes de menos de 40 años, mientras que la edad más avanzada (a partir de los 60) empeora el pronóstico. Otros factores como la duración de los síntomas previa al diagnóstico mayor a 6 meses son de buen pronóstico, mientras que los cambios de personalidad y el deterioro del estado mental son factores desfavorables.

El estado funcional del paciente, medido a través del índice de Karnofsky es también relevante para establecer un pronóstico. Esta información es relevante para la toma de decisiones clínicas y para valorar así el impacto de un tratamiento y la progresión de la enfermedad del paciente. El pronóstico es peor en pacientes con un índice de Karnofsky < 70% (Escala 70: Capaz de cuidarse, pero incapaz de llevar a término actividades normales o trabajo activo).

1.4.2. Relacionados con el tratamiento

El tipo de cirugía realizada también tiene gran importancia para el pronóstico de los pacientes. Tal como sugieren varios trabajos, la resección quirúrgica amplia produce una mayor supervivencia que la extirpación parcial o la biopsia, obteniéndose una supervivencia media de 13, 9 y 6 meses, respectivamente (15, 16).

Varios estudios del Brain Tumor Study Group (BTCSG) demostraron que añadir RT a la cirugía influía decisivamente en la supervivencia. En estos ensayos se observó un aumento significativo en la supervivencia de pacientes tratados con RT adyuvante, consiguiendo en ocasiones, doblar la supervivencia media (35 vs. 14 semanas)(17). Tras la finalización de estos ensayos clínicos, la administración de la dosis de RT se aumentó hasta los 60 Gy, observando que a partir de esta dosis, su beneficio se pierde por la aparición de toxicidad debida al tratamiento.

Los gliomas se habían considerado como “**quimio-resistentes**” a los medicamentos antineoplásicos debido a las dificultades para obtener resultados terapéuticos al administrar el tratamiento quimioterapéutico, observándose un bajo índice de respuesta por la presencia de la barrera encefálica. A pesar de que durante mucho tiempo la quimioterapia no fue considerada como una opción, ensayos clínicos en fase III han demostrado la mejoría significativa de la supervivencia al incorporar la quimioterapia a la RT. En pacientes con GBM, la TMZ (8) y los implantes de nitroso-ureas (BCNU) (18) mostraron un aumento de la supervivencia al incorporar ambos tratamientos. Por otro lado, en cuanto a los pacientes con tumores oligodendrogiales anaplásicos, la administración de PCV adyuvante a la RT aumentó también su supervivencia (12, 13).

1.4.3. Relacionados con el tumor

Se ha demostrado la importancia de la clasificación anátomo-patológica de estos tumores según su histología y grado de agresividad para poder establecer un pronóstico adecuado y decidir la mejor estrategia terapéutica. De esta manera, las neoplasias de alto grado de malignidad presentan un peor pronóstico, y la presencia de elementos oligodendrogiales parece conferir una mayor supervivencia al paciente. Sin embargo, los distintos subtipos histológicos de gliomas presentan características moleculares asociadas que pueden constituir factores pronósticos, lo cual se comentará en el siguiente apartado.

2. GENÉTICA DE LOS GLIOMAS

2.1. Mutación de los genes IDH1/IDH2 como evento temprano en la gliomagénesis

La mutación en el gen **IDH1** (cromosoma 2q33) que codifica para la enzima isocitrato deshidrogenasa 1 localizada en el citoplasma, se identificó por primera vez en un estudio de secuenciación masiva realizado en 22 pacientes con GBMs (19). En este trabajo se observó que la mutación en este gen se producía de manera recurrente en el residuo R132, y que era frecuente en pacientes jóvenes con GBMs secundarios. Estudios posteriores han observado que la mutación de **IDH1**, así como la del gen homólogo **IDH2** (mutado en un residuo análogo, R172), está presente en la mayor parte de los gliomas de grados II y III, así como en los GBMs secundarios (50-80%), mientras que está prácticamente ausente en GBMs primarios (5%) astrocitomas pilocíticos (0,01%) o ausente en tumores ependimarios u otros tumores del SNC no gliales (Figura 6) (20, 21), sugiriendo que la mutación en **IDH** constituye un evento temprano en la patogénesis de algunos gliomas.

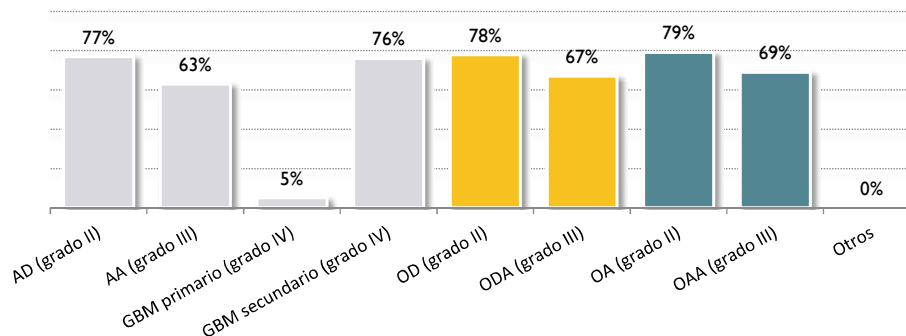


Figura 6. Frecuencias de las mutaciones en *IDH1/2* en los distintos subtipos y grados de gliomas.

Por lo tanto, el conocimiento del estado del gen *IDH* (*IDH1/2*) es de gran valor diagnóstico y de relevancia clínica (22-24). Por un lado es útil en el diagnóstico diferencial de oligodendrogliomas con otros tumores de características histológicas parecidas o de tipo neuronal o ependimarios, y por otro en la distinción de la gliosis reactiva frente a tumor. Desde el punto de vista clínico se ha observado que la mutación de *IDH1* tiene valor pronóstico y así, un GBM con mutación tendría incluso mejor pronóstico que un astrocitoma de grado III sin mutación.

La **implicación funcional** de las mutaciones de *IDH1* e *IDH2* en el desarrollo de los gliomas no está del todo establecida (Figura 7). Una hipótesis es que la pérdida de función de esta enzima, que cataliza la descarboxilación oxidativa del isocitrato y lo transforma en α -cetoglutarato (α -KG) produciendo NADPH (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*), provocaría una reducción de α -KG, y por tanto una acumulación del factor inducido por la hipoxia (HIF-1 α) dando lugar a un incremento de la angiogénesis (25). La otra hipótesis que se ha planteado es que esta mutación hace que la proteína mutante adquiera una nueva función, convirtiendo el α -KG en el **oncometabolito 2-hidroxiglutarato** (2-HG), el cual se ha observado que se acumula en gliomas (26). Este oncometabolito 2-HG acabaría compitiendo por el sitio activo de las histonas demetiladas (HDM) y 5-metilcitosina hidroxilasas (5-hmC; familia TET2) (27) causando **alteraciones epigenéticas** y bloqueando así la diferenciación celular (28, 29). Además, se ha observado que al inhibir la demetilación de las histonas, la mutación de *IDH* provoca un patrón global de hipermetilación aberrante (fenotipo hipermetilador, CIMP+) acompañado por cambios en la compactación de la cromatina y silenciamiento génico (30).

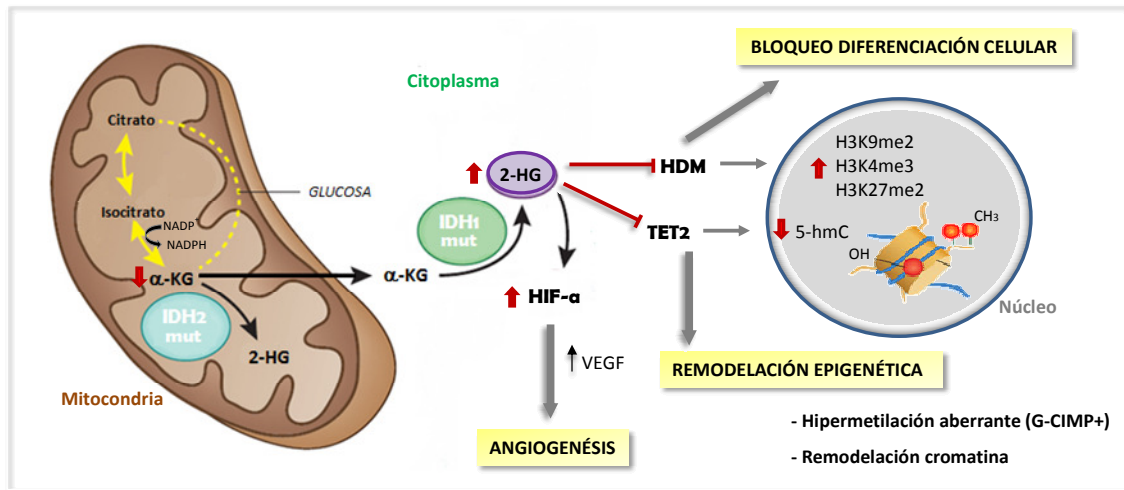


Figura 7. Posible implicación funcional de las mutaciones en los genes *IDH1/2*. El gen *IDH2* se localiza en las mitocondrias mientras *IDH1* en el citoplasma. Debido a la mutación en estos genes se detecta un aumento de 2-HG, que provocaría una acumulación de HIF-alfa y con ello un incremento de la angiogénesis, así como también la inhibición de las histonas demetilasas y la reducción 5-hmC produciría la hipermetilación aberrante del ADN y la remodelación de la cromatina.

2.2. Alteraciones moleculares en tumores oligodendrogiales

Los análisis genéticos realizados en tumores oligodendrogiales (TO) han demostrado que la alteración genética más frecuente y de mayor importancia en los mismos es **la pérdida del brazo corto del cromosoma 1 (1p) y del brazo largo del cromosoma 19 (19q)**, que suelen producirse de manera conjunta (31-33). El mecanismo que explica esta pérdida conjunta se ha postulado a través de la identificación de una traslocación centromérica o pericentromérica $t(1;19)(q10;p10)$ tras la cual se produciría la pérdida del cromosoma derivado que contiene 1p y 19q (Figura 8) (34, 35). En tumores oligodendrogiales, la codelección de 1p/19q se ha descrito en porcentajes variables en función de su histología, según sean tumores oligodendrogiales clásicos (50-90%) o tumores con histopatología mixta oligodendrogial y astrocitaria (30-50%) (36, 37).

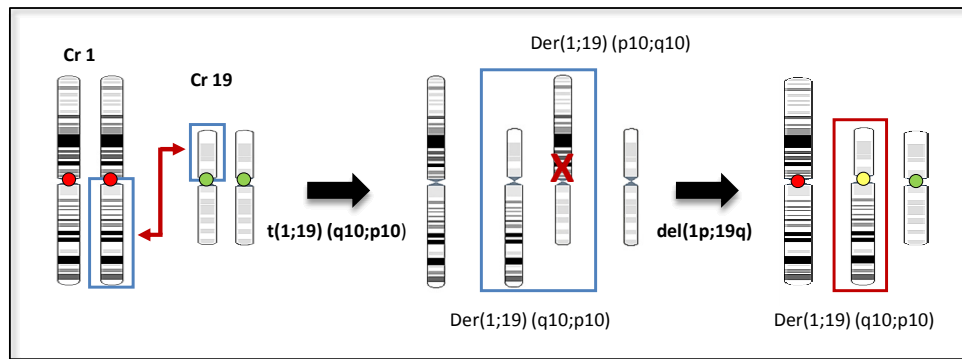


Figura 8. Representación del proceso de pérdida combinada de 1p/19q y la previa translocación $t(1;19)(q10;p10)$, mostrando la fusión de las sondas CEP1 (rojo) y 19p12 (verde) cuando se produce la translocación (señal amarilla).

La importancia de la codeleción de 1p/19q reside, en primer lugar, en que aquellos tumores con la pérdida combinada tienen mejor supervivencia global y supervivencia libre de recaída. Así, la supervivencia media de los pacientes con TO y pérdida combinada de 1p/19q es de 7 años, mientras que si no presentan esta alteración es de 2-3 años (12, 38). Por otra parte, estudios posteriores han evidenciado una fuerte asociación entre la codeleción de 1p/19q y la respuesta a la QT, observando que los pacientes con tumores con pérdida de 1p/19q responden mejor a tratamientos radio y quimioterapéuticos. Los datos recientes de ensayos clínicos en fase III en oligodendrogliomas de alto grado (EORTC26951 y RTOG 9402) han demostrado el beneficio de añadir un tratamiento quimioterápico (PCV) a la radioterapia, frente a radioterapia sola, en casos con codeleción de 1p/19q (39, 40). Finalmente, la detección de la pérdida de 1p/19q podría ayudar en el diagnóstico de tumores que histopatológicamente son difíciles de clasificar. Por tanto, esta alteración molecular es un marcador útil para el diagnóstico y para establecer el pronóstico de estos pacientes, así como también es predictivo de respuesta al tratamiento en tumores oligodendrogliales.

Recientemente, mediante estudios de secuenciación masiva, se ha podido identificar una elevada frecuencia de mutaciones que inactivan los genes *CIC* y *FUBP1* (localizados en 19q y 1p, respectivamente) en aquellos oligodendrogliomas con pérdida de 1p/19q, sugiriendo un papel relevante de ambos genes en la patogénesis de estos tumores (41-43) (Figura 9). Sin embargo, la importancia biológica y clínica de estas alteraciones moleculares, todavía no se ha determinado.

2.3. Alteraciones moleculares en tumores de diferenciación astrocitaria

Una de las vías de señalización implicadas en el desarrollo de los GBM es la de *RTK/PI3K/PTEN*, donde por ejemplo, la amplificación o sobreexpresión del gen *EGFR* (*receptor del factor de crecimiento epidérmico*), miembro de la familia de receptores tirosina quinasa (TK), es una característica de los GBM primarios (30-40% presenta esta alteración) y su activación promueve la división y migración celular bloqueando la apoptosis (22, 44). Además, típicamente se encuentra en asociación con la inactivación

del gen *PTEN* (fosfatasa y homólogo de la tensina), ya sea por delección del gen (36%) o del cromosoma 10q (80%) (45). El gen *PTEN* actúa como gen supresor tumoral mediante la inhibición de la vía de señalización AKT. Se encarga de la regulación de los niveles de PIP3 (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato) intracelulares mediante la desfosforilación de estos sustratos. Por lo tanto, las alteraciones en este gen pueden provocar la acumulación de PIP3 en el citoplasma, provocando la activación permanente de esta vía. Además, otras alteraciones que ocurren por esta vía son la amplificación de *PDGFRA* (13%), mutación de *PI3K* (15%) y mutaciones y deleciones de *NF1* (18%) (Figura 9).

Así mismo, otra de las vías alteradas en astrocitomas es la de **P53/MDM2/p14^{ARF}**, identificando mutaciones y deleciones de *CDKN2/ARF* (42%), la amplificación de *MDM2* (14%) o mutaciones de *TP53*, que ocurren en el 40-50% de los astrocitomas grado II/III y en el 71% de los GBM secundarios (44, 46), siendo infrecuente en oligodendrogliomas y en GBM primarios (10%). *TP53* se encuentra en el cromosoma 17 (17p13) y es un gen supresor tumoral que desempeña un papel importante en la apoptosis y el control del ciclo celular. La mutación en este gen disminuye la degradación de la proteína asociándose a una sobreexpresión de la proteína, por ello es posible utilizar la expresión de p53 como marcador de diferenciación astrocitaria (Figura 9). Además, Watanabe y colaboradores en 2009 identificaron que el 63% de los astrocitomas grado II eran portadores de mutaciones en los genes *TP53* e *IDH*, indicando una fuerte asociación entre ambas alteraciones en astrocitomas difusos (47).

Otras alteraciones encontradas en tumores astrocitarios son las deleciones de *CDKN2B* (47%), la amplificación de *CDK4* (18%), mutaciones y deleciones de *RB1* (11%) así como también mutaciones y deleciones en *CDKN2A/p16* (52%), todas ellas formando parte de la vía de señalización **RB1/CDK4/p16^{INK4a}**, clave en la regulación del ciclo celular (19). Todas estas alteraciones se encuentran en casos histológicamente de grado III o IV, por lo tanto, suponen un marcador de progresión (Figura 9).

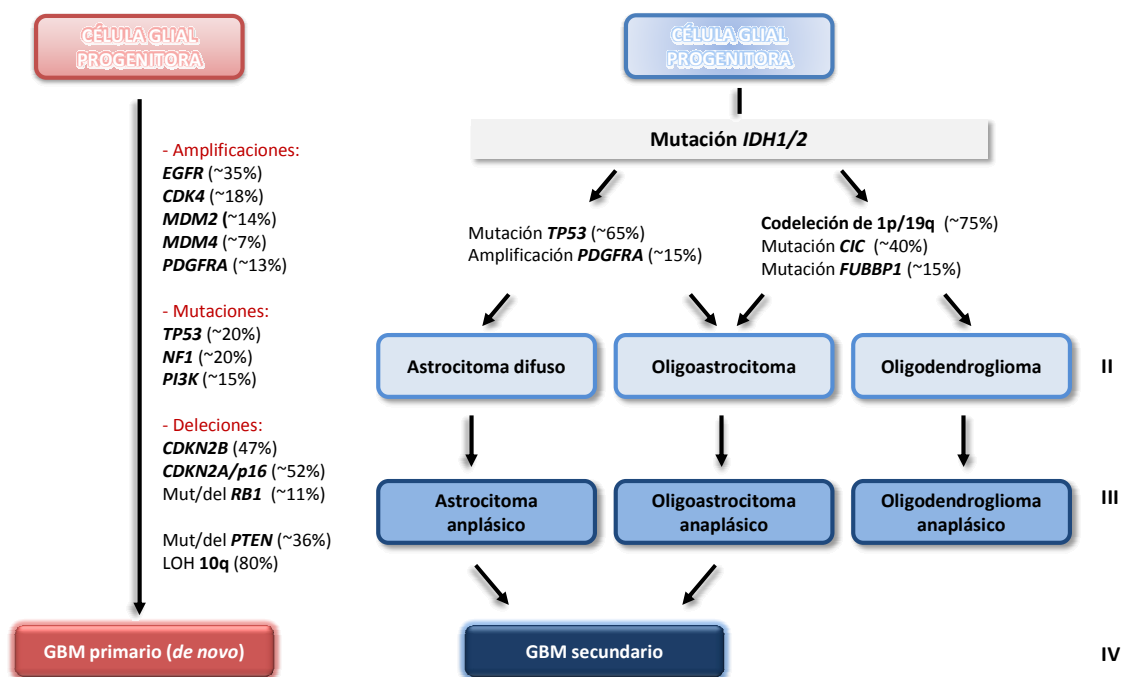


Figura 9. Dentro de los GBM se encuentran dos subtipos que presentan características histológicas similares, aunque las alteraciones moleculares que se asocian a los dos grupos son distintas. Los GBM primarios o de *novo* se caracterizan por presentar amplificación de *EGFR*, pérdida de 10q y/o mutación de *PTEN*, pérdida de *CDKN2A/B/p14ARF* y amplificación de *PDGFRA*, mientras que los GBM secundarios que provienen de la progresión de un As/OA de menor grado, presentan mutaciones en *TP53* e *IDH* más frecuentemente.

2.4. Subtipos moleculares en función de su perfil de expresión génica

En los últimos años se han realizado un elevado número de estudios de perfiles de expresión génica en gliomas para mejorar su caracterización y definir nuevas dianas terapéuticas. En uno de estos estudios (48) en el que se examinaba 107 As de alto grado (grados III y IV) y basándose en una firma molecular de 35 genes, detectaron tres perfiles de expresión distintos: **proneural**, **proliferativo** y **mesenquimal**. El perfil de expresión proneural se detectó en pacientes jóvenes y se asociaba con un buen pronóstico; este grupo se caracterizaba por presentar *PTEN* intacto, *EGFR* normal y la vía de señalización Notch activa. Los subtipos proliferativo y mesenquimal expresaban genes involucrados en proliferación celular y angiogénesis/mesenquima respectivamente, identificándose en pacientes mayores y con un peor pronóstico. Estos subtipos se caracterizaban por presentar alteraciones tales como la pérdida del cromosoma 10, ganancia del cromosoma 7, pérdida de *PTEN*, amplificación de *EGFR* y activación de Akt.

En un trabajo más reciente y con mayor número de muestras (49) se mostró que el perfil de expresión podía separar a los GBMs en cuatro grupos moleculares distintos: proneural, neural, clásico y mesenquimal. El subtipo **proneural** mostró una elevada expresión de genes relacionados con un

desarrollo oligodendrocítico (*PDGFRA*, *NKX2-2*, y *OLIG2*), identificándose en la mayoría de GBM secundarios de edad joven. Este subtipo se asoció con alteraciones en *PDGFRA* y mutaciones de *IDH* y *P53*, así como ausencia de alteraciones en el gen *EGFR*. El grupo **neural** mostró expresión de marcadores neurales, como *NEFL*, *GABRA1*, *SYT1* y *SLC12A5*, con diferenciación astrocitaria y oligodendrogliol, y un perfil similar al de los cerebros no tumorales utilizados como control. Por el contrario, el subtipo **clásico**, con una firma claramente astrocitaria, se caracterizó por la amplificación del cromosoma 7, alteraciones en *EGFR*, pérdida del cromosoma 10, y ausencia de alteraciones en *PDGFRA*, *IDH* o *P53*. Por último, el perfil **mesenquimal** presentó la expresión de marcadores mesenquimales como *CHI3L1* y *MET*, una elevada frecuencia de mutaciones en *NF1* y pérdida de *PTEN*. Además, se observó la elevada expresión de genes asociados a necrosis e inflamación (vías TNF y NF-κB). De este modo, proponen el estudio de las alteraciones en *NF1*, *PTEN*, *IDH*, *PI3K*, *PDGFR* y *EGFR* para la clasificación molecular de los GBM.

Por lo tanto, la identificación de distintos subgrupos moleculares basados en perfiles de expresión génica característicos confirmaría la existencia de heterogeneidad molecular dentro de lo que histológicamente se considera GBM. El hecho de poder definir diferentes grupos de gliomas basándose en perfiles moleculares podría ser clínicamente relevante para crear terapias personalizadas a cada grupo de pacientes.

2.5. Mutaciones en genes remodeladores de la cromatina

Los **telómeros** consisten en múltiples repeticiones cortas (TTTAGG) en los extremos de los cromosomas que protegen contra reordenamientos a gran escala genómica. La longitud de los telómeros y su mecanismo de mantenimiento han ganado interés en los últimos años como posible biomarcador de riesgo de cáncer (50). En la mayoría de las células somáticas, los telómeros se acortan con cada ciclo de replicación, llevando eventualmente a la senescencia celular o apoptosis, así como también al silenciamiento transcripcional de genes situados cerca del telómero (51).

Estudios recientes han identificado mutaciones puntuales en el promotor del gen **TERT** (*telomerase reverse transcriptase*) en astrocitomas grado II, III y GBM primarios, así como en tumores oligodendrogliales de grado II y III (52, 53), que incrementan la expresión de la telomerasa y proporcionan un mecanismo alternativo para el mantenimiento de los telómeros en las células tumorales (Figura 10).

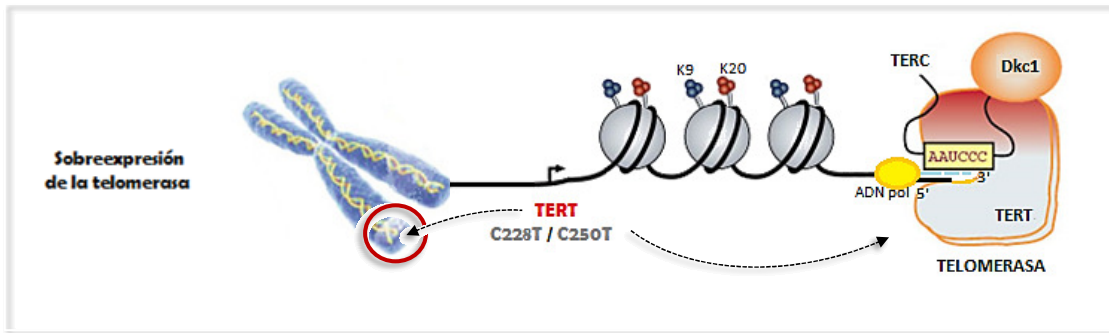


Figura 10. Mutaciones puntuales en el promotor de *TERT* provocan su sobreexpresión afectando al complejo de la telomerasa y llevando al mantenimiento de la longitud de los telómeros de tumores con estas alteraciones.

A su vez, también se han identificado mutaciones en los genes *ATRX* y *DAXX* en GBMs pediátricos y en tumores neuroendocrinos del páncreas (panNETs) (54, 55). Estos genes codifican para dos subunidades de un complejo remodelador de la cromatina necesario para la incorporación de la histona H3.3 en la cromatina y los telómeros, permitiendo la activación o represión transcripcional. Debido a su función en la modulación de la cromatina telomérica, estas mutaciones se asocian con el mecanismo de mantenimiento de los telómeros independiente de la telomerasa denominado alargamiento telomérico (ALT) (56, 57) (Figura 11).

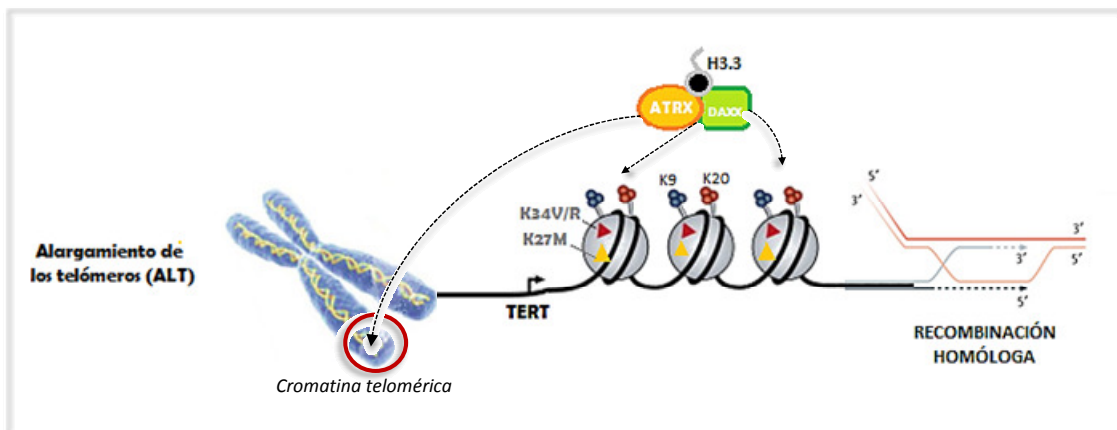


Figura 11. Supuesto mecanismo de la alteración en la longitud de los telómeros en GBM pediátricos mediado por las mutaciones en *ATRX* y *DAXX* que incorporan la histona H3.3 (mutada en G34R/V o K27M) en las regiones subtelo méricas y provocan por recombinación homóloga el alargamiento de los telómeros.

3. EPIGÉNÉTICA

En la actualidad la epigenética se define como el estudio de las modificaciones estables y heredables que causan cambios en la expresión y función de los genes, sin que tenga lugar una alteración en la secuencia del ADN (58). El estado epigenético de un organismo sufre variaciones que se

van acumulando a lo largo de la vida a través de procesos dependientes de factores genéticos y ambientales, fundamentalmente. En los últimos años se ha podido demostrar la gran relación que existe entre las alteraciones genéticas y los cambios epigenéticos, implicados tanto en proliferación e invasión celular, reparación del ADN, apoptosis, angiogénesis y otros, produciendo el desarrollo de un fenotipo maligno (59, 60).

Como mecanismos epigenéticos se incluyen: la metilación del ADN, las modificaciones covalentes de histonas y los RNA no codificantes (microRNAs); todos ellos involucrados en la regulación de la expresión génica y la estructura de la cromatina.

3.1. Metilación en cáncer

El proceso epigenético mejor estudiado es la metilación del ADN, consistente en la incorporación covalente de un grupo metilo (CH_3) a la posición 5' de las citosinas que preceden a guaninas, conocidos como dinucleótidos CpGs. Esta metilación está mediada por las enzimas ADN metiltransferasas (DNMTs), que catalizan la transferencia del grupo metilo de S-adenosil metionina (SAM) a las citosinas del ADN. Estas enzimas catalizan tanto los procesos de metilación de *novo* (DNMT3a y DNMT3b), como el mantenimiento del ADN hemimetilado que se forma tras el proceso de replicación (DNMT1) (61) (Figura 12).

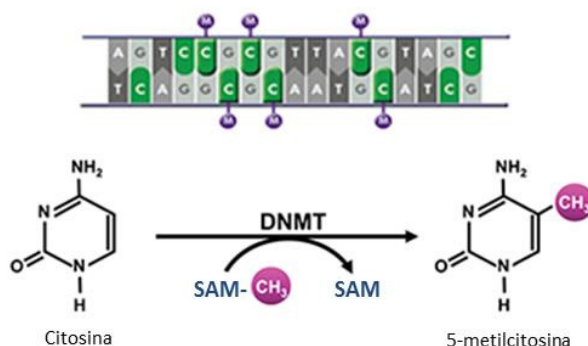


Figura 12. Metilación del ADN mediante las enzimas ADN metiltransferasas

En el genoma, los dinucleótidos CpG se encuentran distribuidos como regiones de mayor densidad (islas CpG) y zonas de menor densidad (shores/shelves). Las islas CpG se localizan preferentemente en las zonas promotoras de los genes, encontrándose normalmente demetiladas en los genes constitutivamente activos, mientras que las CpGs situadas en el resto del genoma, están frecuentemente metiladas (mCpG) (62). Generalmente la metilación del ADN en las islas CpG del promotor de los genes se asocia con el silenciamiento génico, siendo el mecanismo por el que tiene lugar la inactivación de la transcripción. Por el contrario, cuando la metilación ocurre en el cuerpo de los genes ésta se asocia a activación transcripcional.

En cáncer, se ha descrito la existencia de metilación aberrante en el promotor de genes supresores de tumores y genes reparadores del ADN, los cuales pierden su expresión mediante este mecanismo, contribuyendo así a la génesis y progresión tumoral (63, 64). Este es el caso de genes supresores de tumores tales como el gen reparador *MLH1* implicado en cáncer colorectal, el gen de control del ciclo celular *p16^{INK4a}* (*CDKN2A*) involucrado en diversos tumores malignos o el gen *BRCA1* en cáncer de mama. En gliomas se ha descrito la hipermetilación del gen *MGMT*, implicado en la reparación del ADN, como se verá más adelante (65).

3.2. Metilación en gliomas

La importancia de la hipermetilación de los promotores de ciertos genes también se ha observado en gliomas, provocando la inactivación transcripcional de genes asociados con supresión tumoral (*GATA4*, *EMP3*, *RASSF1A*, *NDRG2*), regulación del ciclo celular (*CDKN2A/CDKN2B*), reparación del ADN (*MGMT*), migración (*SOX2*) e invasión tumoral y apoptosis (*SOCS3*, *DAPK1*, *TIMP3*, *CDH1*, *PCDHgamma-A11*, *TMS1/ASC*, *WWOX*) (66).

En los últimos años, uno de los genes más estudiados en gliomas por su posible inactivación debida a la hipermetilación de su promotor y que se ha descrito como marcador de respuesta a tratamientos alquilantes, ha sido *MGMT*, del que hablamos a continuación.

3.2.1. Metilación en el gen *MGMT* (*O*₆-metilguanina-metil-transferasa)

3.2.1.1. Mecanismo de reparación del ADN mediante el gen *MGMT*:

El gen *MGMT*, localizado en el cromosoma 10q26, codifica la enzima reparadora *O*₆-metilguanidina-ADN metiltransferasa, una proteína que está presente tanto en el citoplasma como en el núcleo. Esta proteína tiene un papel relevante en el mantenimiento de la integridad del ADN de las células normales, retirando los puentes alquilo de la posición *O*⁶ de la guanina en la vía de reparación directa del ADN. Para ello, el grupo alquilo-*O*⁶ de la guanina se transfiere al sitio activo de *MGMT* (cisteína 145), provocando la reparación del ADN y a su vez la auto-inactivación de la molécula de *MGMT* (67). Seguidamente, la molécula de *MGMT* unida al ADN, provoca la alteración de la conformación del dominio de unión a ADN, permitiendo su separación del ADN para así degradarse por el sistema ubiquitina/proteasoma (Figura 13) (68). Por lo tanto, la capacidad de reparación celular del ADN, depende del número total de moléculas de *MGMT* por célula y de su síntesis de *novo* (69).

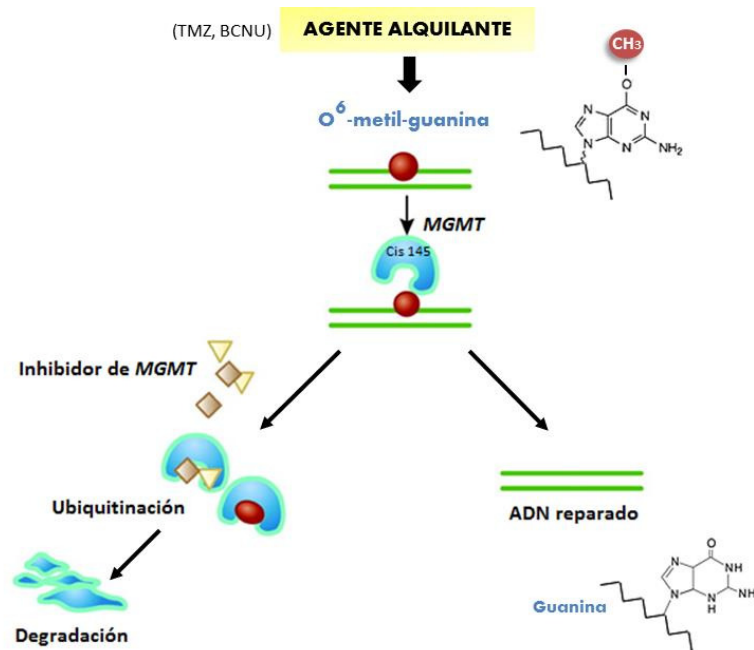


Figura 13. Mecanismo de reparación del ADN mediado por la enzima *O*⁶-metilguanina-metiltransferasa. El grupo alquilo incorporado por el tratamiento quimioterapéutico o por otros agentes que dañan el ADN, se representa como una bola roja. Adaptada de Liu L. and Gerson S L Clin Cancer Res 2006.

3.2.1.2. Inactivación del gen *MGMT*:

La metilación de la región promotora de *MGMT* provocaría el silenciamiento del gen al inhibirse su expresión, y por tanto, su función reparadora. Como ya hemos mencionado anteriormente, los agentes alquilantes (TMZ) producen la unión de un grupo alquilo en la posición *O*⁶ de la guanina, induciendo la apoptosis en células proliferantes. Por lo tanto, en células tumorales, cuando el promotor está metilado pierde su capacidad para retirar los grupos alquilo, y estas células son más sensibles a los agentes alquilantes. En cambio, cuando el promotor del gen *MGMT* no está metilado, éste repara el daño celular producido por la quimioterapia y el tratamiento no sería efectivo (Figura 14).

La función reparadora de *MGMT* ha sugerido que su inactivación por hipermetilación en la región promotora podría tener un valor predictivo de respuesta y asociarse con una mayor supervivencia en aquellos pacientes con gliomas tratados con radioterapia y agentes alquilantes (70).

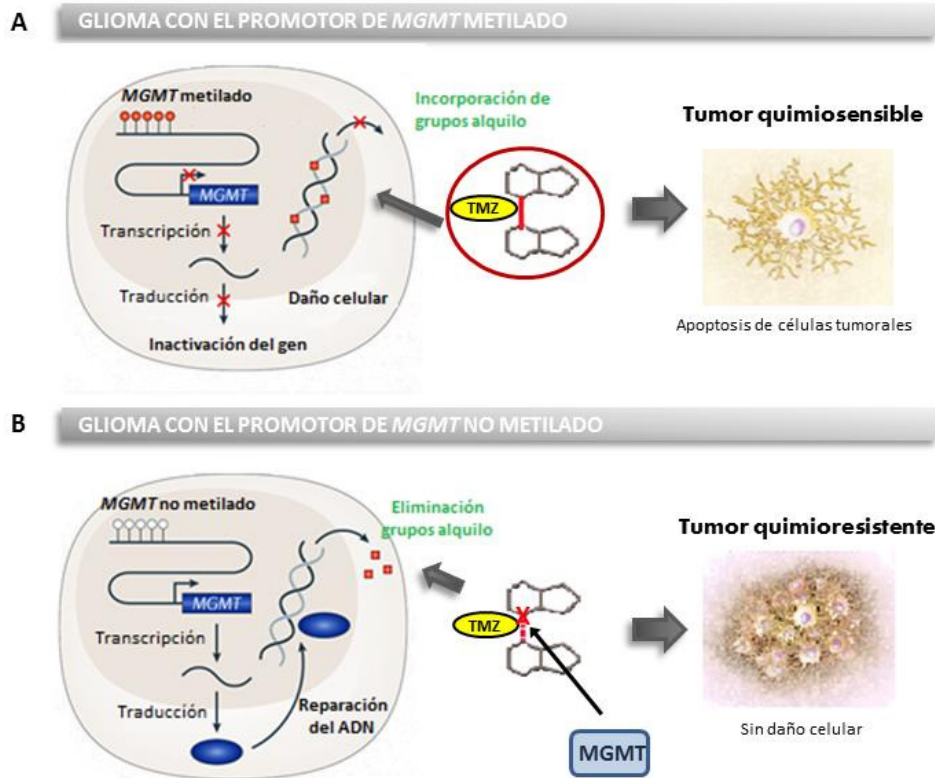


Figura 14. (A) Cuando el promotor del gen *MGMT* no está metilado se repara el daño celular producido por los grupos alquilantes (cuadrados rojos) de la quimioterapia (TMZ) y el tumor es quimiorresistente. **(B)** Si el promotor de *MGMT* se encuentra metilado, no se retiran los grupos alquilo y los tumores serían más sensibles al tratamiento. Adaptada de Esteller et al., 2000 y Holger Heyn & Manel Esteller, 2012

3.2.1.3. Valor predictivo y pronóstico de la metilación de *MGMT*:

La frecuencia de esta alteración en gliomas varía ampliamente, detectándose entre el 60-70% de los oligoastrocitomas, 20-68% de GBMs y 40-75% de astrocitomas difusos y anaplásicos (70-74).

Ensayos clínicos como el EORTC-26981-22981/NCIC sugieren que la determinación de la metilación de *MGMT* es un factor predictivo de respuesta a tratamientos concomitantes y adyuvantes con TMZ y RT en pacientes con GBM (8, 71), observando una supervivencia media de 21,7 meses en pacientes tratados con TMZ y RT vs. 15,3 meses en pacientes únicamente tratados con RT. Recientemente, estos resultados se han observado incluso en pacientes mayores de 65 años (75-79), con índices de supervivencia más elevados en pacientes con tumores que presentaban *MGMT* hipermetilado en la rama de TMZ frente a los de la rama de RT. Sin embargo, el estudio NOA-08 (79), realizado en pacientes mayores con GBM y AA, únicamente detectó el beneficio en términos de supervivencia libre de progresión (SLP), mientras el estudio Nórdico (76) demostró el beneficio de la metilación de *MGMT* en términos de supervivencia global (SG) para aquellos tratados con TMZ, mientras el efecto de la RT fue

independiente al estado de *MGMT*. A pesar de todos estos estudios, todavía se cuestiona su relevancia clínica (72-74, 80) (Tabla 3).

En cuanto al papel de este marcador en gliomas anaplásicos (grado III de la OMS), varios estudios (EORTC-26951 y NOA-04) han demostrado, que a diferencia de lo que ocurre en GBM, en los que la hipermetilación de *MGMT* tiene un valor predictivo de respuesta a quimioterapia, en el caso de los oligodendrogliomas anaplásicos, esta metilación sería únicamente un factor pronóstico, es decir, la supervivencia global no dependería del tratamiento administrado, sino del estado de metilación del gen *MGMT* (14, 81) (Tabla 3).

Los resultados de estos dos estudios sugerían que el significado clínico de la metilación del promotor del gen *MGMT* podría ser diferente en los tumores oligodendrogliales anaplásicos respecto a los GBM, por lo que serían necesarios más estudios confirmatorios para establecer esta alteración como posible marcador predictivo o pronóstico en gliomas. Además, cabe destacar que aunque parece que se benefician más del tratamiento con TMZ los pacientes con GBM y *MGMT* hipermetilado, hasta la fecha, no hay un fármaco alternativo y eficaz para aquellos pacientes sin metilación del gen.

Tabla 3. Estudios sobre la significación clínica de la metilación del promotor de *MGMT* en gliomas

Estudio	Pacientes	Histología	% Metilación <i>MGMT</i>	Método	Factor predictivo	Factor pronóstico
Esteller et al., 2000	47	GBM y AA	41%	MSP	SI	NO
Hegi et al., 2004*	38	GBM	68%	MSP	SI	SI
Paz et al., 2004	92	GBM y Gr. III	30,4%	MSP	NO	-
Hegi et al., 2005*	206	GBM	45%	MSP	SI	SI
Brandes et al., 2006	54	OAA y OA	69%	MSP	NO	NO
Criniere et al., 2007	219	GBM	58%	MSP	SI	SI
Wick et al., 2007	36	GBM	44%	MSP	NO	NO
Brandes et al., 2008	103	GBM	35%	MSP	SI	SI
Brandes et al., 2009	58	GBM	34%	MSP	SI	-
Brandes et al., 2009	37	GBM	43%	MSP	SI	SI
Dunn et al., 2009	109	GBM	53%	Pirosec.	SI	SI
Weller et al., 2009	301	GBM	44%	MSP	SI	SI
Wick et al., 2009*	318	Gliomas grado III	71%	MSP	NO	SI
Van den Bent et al., 2009*	153	OAA	84%	MS-MLPA	NO	SI
Malstrom et al., 2012*	291	GBM	45%	qMSP	SI, SG	NO
Wick et al., 2012*	373	GBM y AA	35%	MSP/qMSP	SI, SLP	NO

* Estudios prospectivos

3.2.2. Metilación global del genoma en gliomas

Gracias al estudio global de la metilación del genoma (metiloma) mediante microarrays, se ha podido caracterizar mejor el patrón de metilación de los tumores, permitiendo detectar perfiles específicos de metilación y, en consecuencia, proporcionando información útil sobre la clasificación de los distintos tumores y su pronóstico. En gliomas, concretamente en GBM secundarios, Noushmehr y colaboradores en 2010 identificaron por primera vez un perfil hipermetilador **G-CIMP+** (*CpG island methylator phenotype*) (82). Este patrón en el que los tumores presentaban altos niveles de metilación en todo su genoma, parecía estar asociado a la mutación del gen *IDH* (Tabla 4).

A su vez, en estos tumores, el perfil CIMP+ se ha visto asociado con un buen pronóstico (82-85), mientras en otros tipos de tumores como en cáncer colorectal, este perfil hipermetilador se ha correlacionado con peor supervivencia global de los pacientes (86).

Tabla 4. Resumen de los estudios de perfiles de metilación realizados en gliomas.

Autor/año	Plataforma	Nº CpGs / genes	Muestras	Genes hipermetilados	Resultados relevantes
Martínez et al., 2009	GoldenGate Methylation	1,505 CpGs (807 genes)	87 GBMs	<i>HOXA11, HOXA9, HOXA5, ZNF215, CD81, PRKCDBP, TES, MEST, TNFRSF10, FZD9, GATA6</i>	Perfil de metilación asociado con SG. Confirman el valor pronóstico de la metilación de <i>MGMT</i>
Wu et al., 2010	Methylated CpG island recovery assay (MIRA)	28,000 CpGs (18,000 promotores)	30 As (I-IV)	<i>BMP4, POU4F3, GDNF, OTX2, NEFM, CNTN4, OTP, SIM1, FYN, EN1, CHAT, GSX2, DLX2, PAX6, HOXC, HOX1</i>	Genes metilados relacionados con diferenciación neuronal. Posible implicación en gliomagénesis
Noushmehr et al., 2010	GoldenGate Methylation	1,505 CpGs (807 genes)	272 GBMs	<i>GOS2, RBP1, C11orf63, KIAA0746, LDHA, TMEM22, TRIP4, OCIAD2, EPHX2</i>	Identificación de G-CIMP+ asociado a mutación en <i>IDH</i> , perfil de expresión proneural y mejor SG
Brock C. Christensen et al., 2011	GoldenGate Methylation	1,505 CpGs (807 genes)	131 gliomas (EP, AP, OA, OD, As, GBM)	<i>HOXA11, HOXA9, HOXA5, ZNF215, TES, MEST, TNFRSF10, FZD9</i>	CIMP+ asociado a mutación en <i>IDH</i> y mejor SG
Laffaire et al., 2011	GoldenGate Methylation	1,505 CpGs (807 genes)	36 GBMs y 33 Gr. II	<i>CD81, TES, MEST, FZD9, TNFRSF10, NEBL1, FGFR3, KIT, MET, TGFB2, TNFRSF1B</i>	G-CIMP- en los GBM de <i>novus</i> y G-CIMP+ asociado a mutación en <i>IDH</i> en Gr. II y GBM sec.
Van den Bent et al., 2011	Infinium HM-27K	27,578 CpGs (14,476 genes)	68 TOs anaplásicos	-	Asociación del CIMP con <i>IDH</i> , 1p/19q y metilación de <i>MGMT</i> . Valor pronóstico de <i>MGMT</i> debido al CIMP
Sturm et al., 2012	Infinium HM-450K	485,000 CpGs	136 GBM	-	Identifican 6 subgrupos de GMBs, asociado a características clínicas y moleculares
Bady et al., 2012	Infinium HM-450K	485,000 CpGs	63 GBM	Análisis de metilación del gen <i>MGMT</i> (176 CpGs)	2 CpGs asociadas con SG

3.3. Modificación de histonas

Otro mecanismo epigenético, más complejo que la metilación del ADN, es el que se produce en las histonas. El nucleosoma es la unidad de repetición fundamental de la cromatina, y se compone por un octámero de proteínas que contiene dos copias de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4, junto con un fragmento de 147 pares de bases de ADN que las envuelve (Figura X).



Figura 15. Niveles de compactación de la cromatina.

Las histonas presentan una cola amino terminal que sobresale del octámero constituido por el ADN y las proteínas, lo que las hace más susceptibles a experimentar modificaciones post-transcripcionales. Las modificaciones más estudiadas y que han sido asociadas con la activación o represión de la transcripción son: acetilación, metilación y fosforilación, siendo las dos primeras las que tienen un papel notable en la carcinogénesis (63, 87). Cada una de estas modificaciones es capaz de afectar a la compactación de la cromatina, conduciendo a alteraciones en la reparación del ADN, la replicación y en la transcripción de genes.

Por un lado, la **acetilación** de residuos de lisina está regulada por el complejo enzimático de las histonas acetil-transferasas (HAT) y las histonas deacetilasas (HDAC). La acetilación neutraliza la carga positiva de los residuos de lisina, debilitando el vínculo entre el ADN y las colas de histona (88). Por ello, la acetilación de histonas está ligada a la activación transcripcional, mientras que la deacetilación se asocia generalmente con represión de la transcripción (89) (Figura 16). Por otra parte, la **metilación** de las histonas se produce principalmente en los residuos de lisina (mono, di o trimetiladas) o arginina (mono o di-metiladas) y está regulada por histonas metiltransferasas (HMT) y demetilasas (HDM). Por ejemplo, la metilación de la histona 3 puede activar (H3K4me2, H3K4me3) o reprimir (H3K9me2, H3K27me3) la transcripción dependiendo de la posición del aminoácido en la histona que se metile (90, 91) (Figura 16).

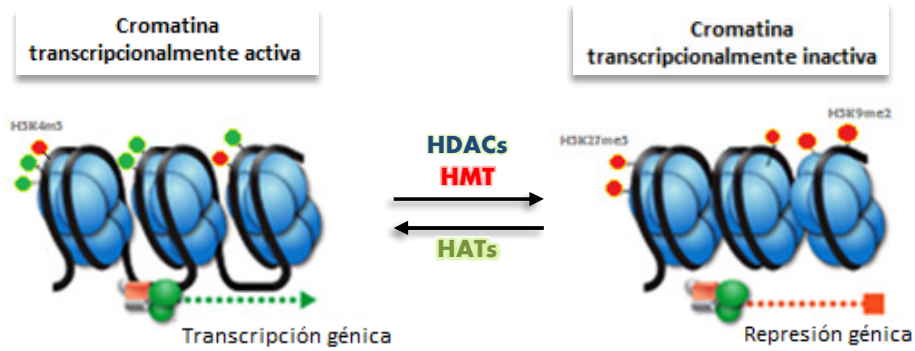


Figura 16. Activación o represión de la transcripción mediante acetilación (bolas verdes) y metilación (bolas rojas) de las histonas.

Recientemente, se han identificados alteraciones en GBM a nivel de las histonas que podrían tener un papel importante en la gliomagénesis. Desde mutaciones en histonas deacetilasas (HDAC2 y HDAC9), en histonas demetiladas (JMJD1A y JMJD1B) o histonas metiltransferasas (SET7, SETD7, MLL, MLL3 y MLL4) (19). Por otro lado, en GBM pediátricos se han detectado mutaciones en los genes *H3F3A* y *HIST1H3B*, que codifican para la histona H3.3 (K27M, G34R/G34V) y H3.1 (K27M), respectivamente (54, 92). Estas alteraciones producen modificaciones post-transcripcionales y afectan a la función de la histona H3 en la regulación de la expresión génica.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los gliomas constituyen el segundo grupo de tumores más frecuente dentro de las neoplasias del Sistema Nervioso Central y presentan un comportamiento clínico y biológico heterogéneo. Actualmente, el diagnóstico de estos tumores se basa exclusivamente en los criterios histopatológicos establecidos por la OMS, clasificándose en función del subtipo y grado histológico. A pesar de ello, en ocasiones la clasificación histológica de los gliomas, en particular la de los tumores mixtos, puede ser difícil debido a que su interpretación morfológica está sujeta a la variación entre los distintos observadores. Nuestra hipótesis es que la identificación de las distintas alteraciones moleculares en estos tumores podría contribuir en la mejora del diagnóstico histológico, así como aportar información sobre el pronóstico de los pacientes e incluso para la elección de a terapia más adecuada.

Basándonos en esta hipótesis, el objetivo global de este trabajo consistió en estudiar diferentes factores epigenéticos y genéticos, tratando de correlacionarlos con características histopatológicas y clínicas que pudieran ser útiles para el diagnóstico, establecimiento del pronóstico y tratamiento de los pacientes con gliomas.

Los objetivos concretos planteados fueron los siguientes:

- 1.- Analizar las alteraciones moleculares descritas más frecuentes en los gliomas: la mutación de *IDH*, codeleción de 1p/19q, alteración de *TP53*.
- 2.- Estudiar si la presencia de la translocación t(1;19)(q10;p10) puede ser útil en la determinación de la codeleción de 1p/19q mediante FISH.
- 3.- Examinar el papel de la expresión de la proteína ATRX en la clasificación de los gliomas y su valor pronóstico.
- 4.- Estudiar de forma global la metilación del genoma en los tumores oligodendrogiales.
- 5.- Correlacionar los perfiles de metilación y transcriptómicos con otros parámetros moleculares y clínicos.
- 6.- Determinar si la metilación del gen *MGMT* es un buen marcador pronóstico y/o predictivo de respuesta a tratamiento en gliomas.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

4. RECOGIDA DE MUESTRAS Y SELECCIÓN DE PACIENTES

Las muestras utilizadas en este estudio se recogieron en seis hospitales españoles incluidos en el Banco Nacional de Tumores (Hospital Virgen de la Salud, Hospital 12 de Octubre, Complejo Hospitalario Xeral-Cies, Hospital Universitario La Paz, MD Anderson Internacional y Hospital Clínic de Barcelona). Se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes y la investigación fue aprobada por el Comité Ético del Hospital Virgen de la Salud, Toledo.

El diagnóstico anátomo-patológico de las muestras se realizó en cada hospital mediante tinción de las secciones tumorales con hematoxilina-eosina (H&E) y de acuerdo a los criterios establecidos por la OMS (3). Posteriormente las muestras fueron revisadas por varios patólogos para establecer un diagnóstico de consenso. Después del diagnóstico, los pacientes recibieron tratamientos estándar de radioterapia y quimioterapia según protocolo clínico. Se recogieron datos clínicos como el grado tumoral, la edad, el sexo y la supervivencia global de los pacientes.

En la siguiente tabla se recoge el número de muestras utilizadas para cada uno de los estudios realizados de acuerdo al subtipo histológico analizado:

Tabla 5. Resumen de las muestras utilizadas para cada estudio:

ESTUDIO	OD II	OD III	OA II	OA III	A II	A III	GBM	TOTAL
Microarray de metilación	19	14	5	8	-	-	-	46
Microarray expresión génica	8	6	3	8	-	-	-	25
Metilación del gen <i>MGMT</i>	19	14	5	8	-	-	68	114
Caracterización molecular	39	29	23	17	34	22	108	272
Alargamiento telomérico (ALT)	3	4	10	10	7	-	13	47
Translocación t(1;19)(q10;p10)	3	1	4	5	-	-	-	13

Además, se incluyeron los siguientes controles para cada uno de los experimentos:

- **Estudio de metilación global:** se utilizaron cinco muestras de tejido cerebral no tumoral (CN) procedente de autopsias.

- **Estudios de expresión génica:** Se incluyeron muestras de tejido no tumoral, cuatro de ellos obtenidos de autopsias y otros dos comerciales de *Stratagene* (La Jolla, CA) y *Clontech* (Mountain View, CA).
- **Expresión proteica en tissue microarray (TMA):** Cada una de las matrices de tejido incluía muestras de cerebro normal y amígdala, como tejido control. Todos los controles se incluyeron por duplicado.

5. METODOLOGÍA

5.1. Extracción de ácidos nucleicos y cuantificación

Para la realización de los estudios moleculares se llevó a cabo la extracción de ADN genómico y ARN total a partir de tejido congelado, el cual previamente se confirmó que era tumoral mediante la tinción con H&E de un corte representativo. Para la obtención de **ADN**, se realizaron cortes del tejido congelado que se trató con una solución de lisis (Tris-HCl 2M, pH 7,5, MgCl₂ 1M) con proteinasa K (10 mg/ml) a 40°C, se purificó mediante métodos estándares basados en fenol:cloroformo.

El **ARN total** se aisló utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA). Para su extracción se añadió 0.5 ml de Trizol por 35 mg de tejido y se homogeneizó mediante una jeringa. A continuación, para permitir la separación de fases nucleoproteicas, se utilizó cloroformo (100µl por cada 500µl de TRIzol) y posteriormente se precipitó el ARN con isopropanol. Tras lavados del ARN con etanol frío al 70%, se resuspendió en agua libre de RNAsas.

La concentración y pureza de los ácidos nucleicos se midió en un espectrofotómetro *NanoDrop-1000* (NanoDrop Technologies Inc.) a absorbancias de 260 y 280nm. Se consideró ADN puro cuando se obtuvo una ratio de absorbancia 260/280 de aproximadamente 1,8, en cambio para el ARN la ratio óptima era de 2,0. La calidad del ARN se observó en geles de agarosa al 1% para comprobar su integridad.

5.2. Identificación de mutaciones somáticas en los genes *TP53* e *IDH1/2*

Se determinó el estado mutacional de los genes *TP53*, *IDH1* e *IDH2* mediante las técnicas y condiciones que se describen a continuación:

5.2.1. Análisis mutacional de los genes *TP53*, *IDH1* e *IDH2* mediante HRM

Para el análisis mutacional del gen *TP53* se estudiaron los exones 5 a 8, los más frecuentemente mutados, utilizando cebadores específicos para la amplificación de cada uno de ellos (Tabla 6). El estudio de los codones 132 de *IDH1* y 172 del gen *IDH2* se realizó con los siguientes cebadores (Tabla 6).

Tabla 6. Secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación de los genes *P53* (93) e *IDH* (94, 95).

Gen (Exón)	Cebador Forward (5'-3')	Cebador Reverse (5'-3')	Producto PCR (pb)	Tª anealing
<i>P53</i> (5)	TCCTTCCTCTTCTACAG	ACCCTGGGCAACCAGCCCTGT	248	60°C
<i>P53</i> (6)	ACAGGGCTGGTTGCCAGGGT	AGTTGCAAACCAGACCTCAGGC	184	60°C
<i>P53</i> (7)	TCCTAGGTTGGCTCTGACTGT	GGTGGCAAGTGGVTCCTGACCTGGAGTCT	136	60°C
<i>P53</i> (8)	GGGACAGGTAGGACCTGATTCCTTACTGCCT	ATCTGAGGCATAACTGCACCCTTGG	255	60°C
<i>IDH1</i>	ACCAAATGGCACCATACGA	GCAAATCACATTATTGCCAAC	164	55°C
<i>IDH2</i>	AGCCCATCATCTGCAAAAAC	CTAGGCGAGGAGCTCCAGT	150	58°C

La técnica empleada para la detección de mutaciones en ambos genes fue la de *High Resolution Melting* (HRM) con el sistema de PCR a tiempo real, *LightCycler 480 II* (Roche) (Figura 17). De este modo, se pudo hacer un cribaje previo y diferenciar las muestras mutadas de las no mutadas (wild-type).

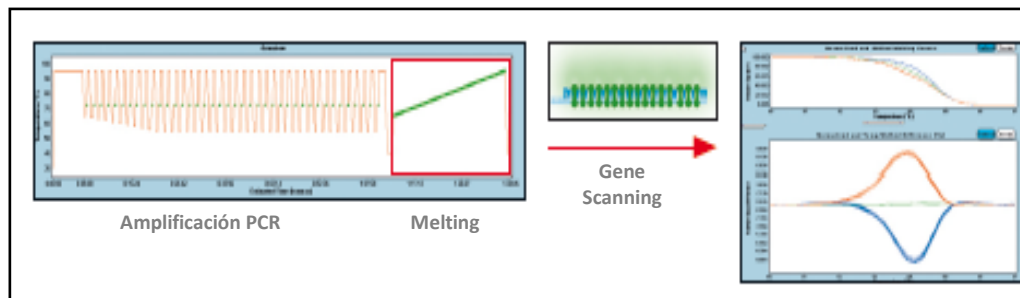


Figura 17. La técnica de HRM utiliza un fluorocromo saturante que se une a la doble cadena de ADN. Después de la amplificación de los productos de PCR y posterior rampa de calor, se produce el análisis de las curvas de fusión. La detección de pequeños cambios en estas curvas permite identificar la presencia de variaciones en la secuencia de ADN. Por último, y con el uso de controles adecuados, se realizó el análisis de las curvas de disociación (melting) provocado por el aumento de la temperatura en los productos amplificados.

Para ello, realizamos una amplificación a partir de 100ng de DNA, *Master mix* 1x (que contiene Taq polimerasa y dNTPs), $MgCl_2$ a 2,5-3mM y 10µM de cada cebador en un volumen final de reacción de 20µl. Las condiciones de amplificación fueron: una desnaturalización a 95°C durante 5 minutos seguida de 50 ciclos a 95°C durante 10 segundos, 10-30 segundos a la temperatura de anillamiento de los cebadores menos 5°C (Tabla 6) y, 10 segundos a 72°C. Para la realización de las curvas de fusión se

sometieron los productos amplificados a un aumento de la temperatura de desnaturalización de 60°C a 95°C a una velocidad de 0,2°C/segundo.

Los productos amplificados obtenidos que presentaban un patrón similar al control mutado, se testaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% y seguidamente se purificaron para comprobar la presencia de mutación mediante secuenciación directa.

5.2.2. Purificación y secuenciación de los productos amplificados

La purificación de los productos amplificados se realizó mediante columnas con el Kit de QIAGEN (*QIAquick PCR purification*), siguiendo las instrucciones del fabricante para eliminar los restos de cebadores y dNTPS procedentes de la reacción de PCR. La reacción de secuenciación del producto de PCR purificado se realizó con el kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit utilizando el cebador Forward o Reverse a 3,2 µM en un volumen final de 10µl. Las condiciones de la reacción de secuenciación fueron las siguientes: 3 minutos a 96°C, 25 ciclos de 10 segundos a 96°C, 5 segundos a 50°C y 4 minutos a 60°C. El secuenciador utilizado fue *ABI PRISM 310 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, USA) y el análisis mutacional de las secuencias obtenidas se realizó con los programas *Sequencing Analysis 5.1.1* (Applied Biosystems) y *Chromas Lite 2.1.1*. Las mutaciones somáticas se determinaron utilizando la base de datos de alineamiento de secuencias (BLAT, UCSC Genome Browser).

5.3. Hibridación “in situ” fluorescente (FISH)

La detección de la pérdida combinada de los brazos 1p y 19q, la translocación t(1;19)(q10;p10) y el alargamiento telomérico se realizó mediante hibridación “in situ” fluorescente (FISH), técnica que nos permite detectar secuencias de ácidos nucleicos en células, cromosomas o tejidos fijados.

5.3.1. Preparación y pre-tratamiento del tejido incluido en parafina

Se hicieron cortes de 2-5µm de espesor de las muestras incluidas en parafina, marcándose la zona tumoral con lápiz diamante tras comparación con un corte consecutivo teñido con H&E. La desparafinación de los cortes se realizó en una estufa a 65°C durante toda la noche y con tres lavados posteriores en xilol durante 5 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se hicieron pases decrecientes de etanol para rehidratar el tejido (100%, 80%, 70% durante 1 minuto cada uno) y se dejaron en agua destilada hasta el momento del pre-tratamiento por calor. Los cortes se sumergieron en una olla con tampón EDTA 250 mM a pH=8 para la preparación óptima del tejido. El tiempo en la olla varió dependiendo del tamaño del tejido (tejidos pequeños, 5-10 minutos y tejidos grandes, 15-20 minutos) y se lavaron en agua destilada. Después, los cortes se sometieron a una digestión enzimática

con 2,5 mg de pepsina en una solución de 0,1mM de HCl durante 1 hora y 30 minutos a 37°C en cámara húmeda. Para detener la digestión del tejido, se lavaron los cortes en tampón fosfato salino (PBS) durante 5 minutos a temperatura ambiente, se deshidrataron en alcoholes crecientes: etanol 70%, 80% y etanol absoluto, durante 1 minuto en cada paso y se dejaron secar.

Llegados a este punto, las secciones de tejido ya están preparadas para hibridar la sonda de interés, siendo distinta en función del reordenamiento a detectar.

5.3.2. Determinación de la pérdida de los brazos cromosómicos 1p y 19q

Para la identificación de la **codelección de 1p y 19q** se utilizaron 10µl de sonda comercial LSI 1p36/1q25 y LSI 19p13/19q13 *Dual color* (Vysis, Abbott Molecular, Illinois, USA) en cristales independientes y se colocaron cubreobjetos de 18x18mm. Las preparaciones se desnaturalizaron en el hibridador durante 10 minutos a 80°C y se dejó hibridar la sonda toda la noche a 37°C. Se lavaron en solución de lavado post-hibridación 0,4xSSC, 0,3% NP40 durante 2 minutos a 75°C y a 2xSSC, 0,1% NP40 1 minuto a Tª ambiente. Finalmente, los cristales se dejaron secar al aire en oscuridad, se montaron con 10 µl de DAPI/AntiFade (1:1) como tinción de contraste, y se visualizaron en el microscopio de fluorescencia (Olympus BX61) (Figura 18).

Contabilizamos las señales en al menos 100 núcleos aproximadamente y se consideró pérdida de 1p y 19q cuando se observaron dos señales verdes y una roja, o cuatro señales verdes y dos rojas, en más de un 30% de las células analizadas.

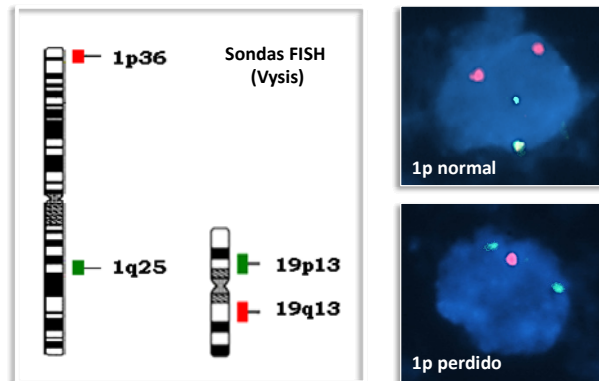


Figura 18. Determinación de la codelección de 1p/19q en tumores oligodendrogiales. Célula con el brazo cromosómico 1p normal (2 señales verdes y 2 rojas) y con 1p delecionado (2 señales verdes y 1 roja).

5.3.3. Determinación de la translocación t(1;19)(q10;p10)

Para la identificación de la **translocación t(1;19)(q10;p10)** se empleó la sonda *CEP1 D1Z5 SpectrumOrange* (Vysis, Abbott Molecular, Illinois, USA) localizada en la región centromérica α -satelite 1

(1p11.1-1q11.1) y diversos BACs (cromosoma artificial bacteriano) marcados con *SpectrumGreen* próximos al centrómero del cromosoma 19 (19p12) (Figura 19). Estos BACs se obtuvieron de Invitrogen (Carlsbad, CA), se crecieron y se obtuvo el ADN para su marcaje y posterior utilización como sonda para FISH.

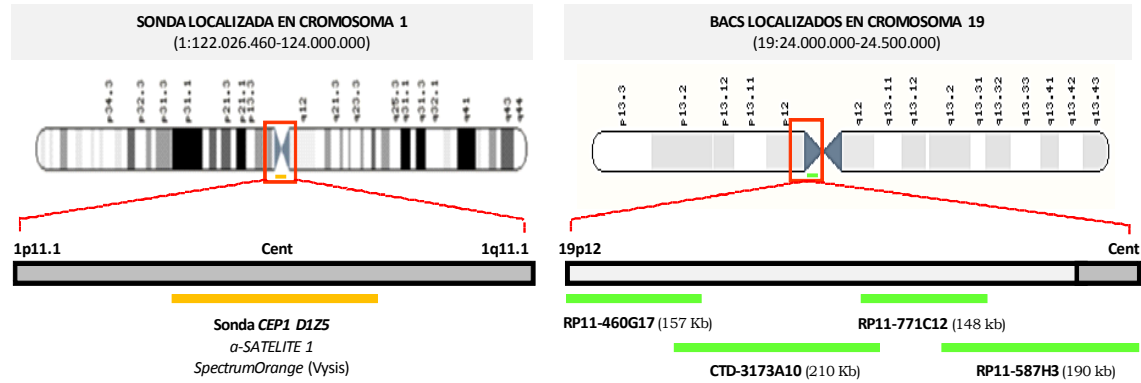


Figura 19. Localización de sondas y BACs para determinar la t(1;19)(q10;p10)

5.3.3.1. Marcaje fluorescente para la obtención de las sondas para FISH

El marcaje del ADN extraído de los BACs localizados en el cromosoma 19 (RP11-771C12, RP11-587H3, RP11-460G17 y CTD-3173A10) se realizó mediante la reacción de *Nick Translation* utilizando el kit comercial y el fluorocromo *SpectrumGreen* de Vysis (Abbott Molecular, Illinois, USA). Los componentes y pasos a seguir fueron los siguientes: se incubó 1 μ g de ADN durante 2h a 15 $^{\circ}$ C en buffer Nick translation 10x, 10 μ l de mix de dNTPs, dTTPs 0,1mM, dUTPs 0,2mM (SpectrumGreen), 10 μ l de mix de enzima polimerasa y ADNasa, y agua hasta un volumen final de 50 μ l. Seguidamente se corrió en un gel de agarosa al 1% para comprobar que el tamaño de los fragmentos obtenidos fuese de 300 a 500 pb. Cuando se observaron fragmentos superiores a 500pb se añadió ADNasa y se dejó actuar 30 minutos más a 15 $^{\circ}$ C. Para inactivar la enzima se añadieron 5 μ l de EDTA 0,5M pH 8 y se incubó 10 minutos a 65 $^{\circ}$ C.

Tras la fragmentación, se realizó la purificación de la sonda marcada para eliminar dUTPs no incorporados mediante precipitación con etanol absoluto, acetato sódico 3M y 20 μ l de ADN Cot-1, incubando durante 1h a -80 $^{\circ}$ C. Éste último servía para bloquear la unión del ADN marcado con secuencias altamente repetidas, como los centrómeros o regiones de la heterocromatina, evitando así, posibles hibridaciones inespecíficas.

Las sondas marcadas se hibridaron en una extensión de linfocitos de sangre periférica para verificar su localización y comprobar la calidad del marcaje sobre extensiones celulares obtenidas de linfocitos de sangre periférica fijadas en Metanol:Acético (3:1).

5.3.3.2. Valoración de la translocación t(1;19)(q10;p10)

Los cortes de tejido parafinado previamente hibridados y lavados se analizaron con el microscopio de fluorescencia, contando señales en 100 núcleos, aproximadamente. Se consideró que existía presencia de la translocación cuando encontramos separadas 1 señal del centrómero del cromosoma 1 (roja) y otra señal en 19p12 (verde) y, por otro lado, 1 señal roja y 1 verde juntas (fusión), en más de un 50% de células tumorales.

5.3.4. Determinación del alargamiento telomérico (ALT)

5.3.4.1. Sondas de ácido nucleico peptídico (PNA)

Para la determinación del alargamiento telomérico se realizó la técnica de hibridación *in situ* fluorescente con sondas de ácido nucleico peptídico (PNA, peptide nucleic acid). Estas sondas son fragmentos sintéticos de ADN donde el esqueleto fosfato del ADN es remplazado por el peptídico (unidades repetidas de poliamida neutra). Debido a que éstas no están cargadas, no tienen que resistir la repulsión electrostática que existe entre las dos cadenas de ADN hibridadas y es por ello que los oligómeros de PNA demuestran una mayor especificidad, reproducibilidad y sensibilidad que las sondas de ADN. (Figura 20). En esta ocasión, la sonda PNA *Alexa Fluor 488* (Panagene, Yuseong-gu, Daejeon, Korea) con secuencia N-CCCTAACCCCTAACCCCTAA-C, reconoce la región telomérica permitiendo la detección del alargamiento telomérico.

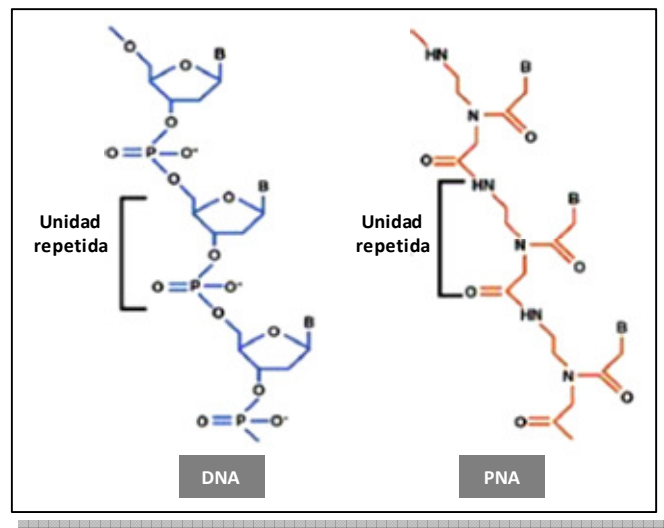


Figura 20. Estructura del ADN comparada con la estructura de una sonda de PNA sintética

5.3.4.2. Procesado de las muestras y detección mediante hibridación in situ con sondas PNA

Una vez se llevó a cabo la desparafinación del tejido, las muestras se trataron con 1% Tween20 durante un minuto y se dejaron incubando 30 minutos en buffer citrato 10x (solución de desenmascaramiento antigénico de Máster Diagnóstica). Seguidamente se lavaron con agua, se deshidrataron y se dejaron secar para poder aplicar la sonda.

Para la hibridación se utilizaron 5µl de sonda PNA marcada en verde junto con 5µl de tampón de hibridación (20mM Na₂PO₄, pH 7,4; 20mM Tris, pH 7,5; 70% Formamida; 2xSSC y 0,1 µg/ml esperma salmón), que previamente se desnaturalizaron sobre los portas a 85°C durante 15 minutos y posteriormente se dejaron hibridar a temperatura ambiente durante 2 horas. Las muestras se lavaron en solución de lavado (2XSSC y 0,1% Tween-20) durante 15 minutos a 60°C dos veces y se tiñeron con DAPI/ AntiFade (1:1).

Las muestras se analizaron en el microscopio de fluorescencia y se consideró que presentaban alargamiento telomérico cuando se observaban “manchas” o agregados fluorescentes de ADN marcado en los núcleos celulares. Como control de esta técnica se utilizaron células fijadas procedentes de una línea celular de osteosarcoma, U2OS, que se han descrito como positivas para el fenómeno del alargamiento telomérico.

5.4. Estudio del perfil de metilación en el genoma completo

Se realizó el estudio de metilación global en el Centro Nacional de Genotipado (CeGen-ISCI) mediante el array *Infinium Human Methylation 450 K BeadChip* (Illumina, San Diego, CA) que examina 485.577 sitios CpG a lo largo del genoma completo. Los datos del análisis de metilación se encuentran depositados en el GEO con número GSE61160. Posteriormente, se validaron los resultados mediante secuenciación directa de muestras tratadas con bisulfito (*Bisulfite Sequencing Analysis, BSA*).

5.4.1. Tratamiento con bisulfito sódico

Para detectar la metilación que se produce en las citosinas de los sitios CpG se trató 1µg de ADN con bisulfito sódico usando el *EZ DNA methylation-Gold Kit* (Zymo Research, Orange, CA). Primero, se desnaturalizó el ADN con calor (10 minutos a 98°C), se añadió el reactivo de conversión CT y se incubó durante 2 horas y 30 minutos a 64°C. Posteriormente, se llevó a cabo la reacción de desulfonación y los lavados del producto siguiendo las instrucciones del fabricante.

El bisulfito sódico (NaHSO_3) produce la conversión de las citosinas no metiladas en uracilo, mientras las citosinas metiladas, que llevan incorporado un grupo CH_3 , permanecen sin cambios, permitiendo así la posterior identificación de las bases metiladas (C) y de las no metiladas (T) (Figura 21).

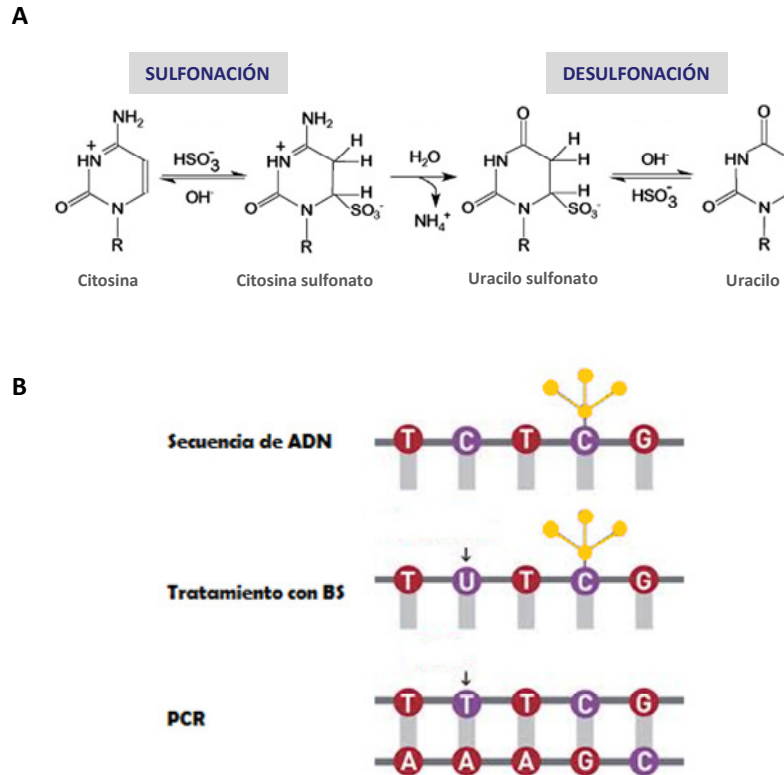


Figura 21. (A) El tratamiento del ADN con bisulfito de sodio (BS) provoca la desaminación de las citosinas no metiladas, generando uracilo. (B) Tras el tratamiento con BS las citosina metiladas (CH_3 en naranja) permanecen intactas mientras las no metiladas se convierten en Timina (T).

5.4.2. Amplificación y fragmentación enzimática

Después de la conversión del ADN con bisulfito, para la preparación de la amplificación del ADN, se desnaturizó y neutralizó siguiendo estos pasos. Se desnaturizaron las muestras con NaOH 0,1N y MA1 (*Multi-Sample Amplification 1 Mix*, Illumina), se centrifugó y se dejó 10 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se neutralizaron las muestras con el reactivo RPM (*Random Primer Mix*, Illumina) y se amplificó el ADN (Whole genome amplification, WGA) con MSM (*Multi-Sample Amplification Master Mix*, Illumina) dejando incubar 24 horas a 37°C en el horno de hibridación. Posteriormente, el producto amplificado se fragmentó enzimáticamente mediante reactivo FMS (*Fragmentation solution*, Illumina), se centrifugó 1 minuto y se dejó incubando a 37°C durante 1 hora.

Tras todo ello, se precipitó el ADN con isopropanol y se dejó a 4°C durante 30 minutos. Después, se centrifugó durante 20 minutos a 4°C , se decantó el sobrenadante y se incubó 1 hora a temperatura ambiente para secar el pellet. Por último, éste se resuspendió en buffer de hibridación RA1

(*Resuspension, hybridization and wash solution*, Illumina) y se dejó en el horno de hibridación a 48°C 1 hora.

5.4.3. Hibridación en el array y lavados

La hibridación se realizó mediante el array *Infinium Human Methylation 450 K BeadChip* (Illumina, San Diego, CA) que nos permite examinar 485.577 sitios CpG a lo largo del genoma completo.

Las muestras, previamente desnaturalizadas (20 minutos a 95°C), se dejaron a temperatura ambiente 30 minutos y se pusieron a hibridar en el chip en una cámara de hibridación en condiciones de humedad a 48°C durante 16 horas en el horno de hibridación. Durante la hibridación, el ADN amplificado se anilló a las sondas del chip, las cuales se encontraban unidas a unas bolas. Estas bolas correspondían a cada locus CpG, una al **estado metilado (C)** y otra al estado **no metilado (T)** (Figura 22).

Tras la hibridación, se lavaron los beadchips para eliminar el ADN no incorporado. Después del anillamiento y los lavados, se produjo la extensión de cada base usando dNTPs y ddNTPs marcados con biotina, se llevó a cabo un proceso de tinción múltiple en capas, siguiendo las recomendaciones del fabricante y, tras lavados finales para retirar los fluoróforos no incorporados durante la extensión, los chips se secaron en una cámara de vacío durante 50 minutos. Por último, se llevó a cabo el escaneo de los chips con el sistema *iScan* (Illumina), el cual lleva incorporado un láser que excita el fluoróforo del producto de extensión de cada base y recoge la señal.

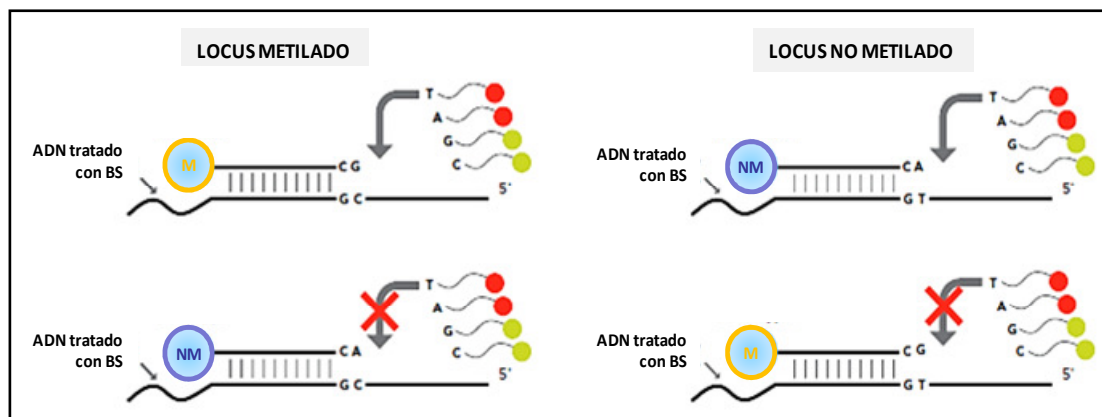


Figura 22. El array de Infinium 450K utiliza dos tipos de sondas diferentes para detectar la metilación de los sitios CpG. El tipo NM coincide con el sitio CpG no metilado, la M con el sitio metilado. En la izquierda, la CpG metilada coincide con la sonda M, lo que permite la extensión de una sola base y su detección. En la derecha, cuando la sonda M no coincide con la CpG de interés (locus no metilado), se inhibe la extensión. Imagen modificada de Illumina, San Diego, CA.

5.4.4. Análisis y procesado de los datos

El nivel de metilación de los locus CpG se determinó calculando la ratio de intensidades entre los alelos metilado y no metilado. Se obtuvo así un valor $\beta = \text{Señal del metilado} / (\text{Señal no metilado} + \text{Señal metilado} + 100)$. Estos datos de metilación obtenidos (β) presentaron valores entre 0-1, cercano a 0 cuando el sitio CpG estaba demetilado y cercano a 1 cuando estaba metilado, y se analizaron con el software *Infinium GenomeStudio* (Illumina), *Microsoft Excel 2010* y *Qlucore Omics Explorer* (Qlucore AB, Lund, Sweden). Los datos se filtraron para eliminar aquellas sondas localizadas en sitios CpG de los cromosomas X e Y, así como las que se encontraban en SNPs. Por lo tanto, los análisis posteriores se realizaron partiendo de **473.864 sitios CpG**.

Se realizaron las medias de las muestras (Avg. β) dentro de cada grupo para realizar las distintas comparaciones entre grupos y clasificar así las sondas como metiladas o no metiladas. Se determinó el umbral de metilación, para cada uno de los sitios CpG, a partir de la diferencia de metilación entre dos grupos. Es decir, cuando esta diferencia era positiva se consideraban sondas metiladas en el primer grupo y cuando era negativa, CpGs no metiladas.

Las categorías utilizadas para las localizaciones genómicas fueron: i) la **región promotora** incluyendo de 201 a 1500 pb (TSS1500) y de 1 a 200 pb (TSS200) anteriores al sitio de inicio transcripcional (TSS), 5'UTR y el primer exón; ii) la **región del cuerpo gen** (del primer intrón hasta el último exón), iii) la **región 3' UTR** y iv) las **regiones intergénicas** (Figura 23).

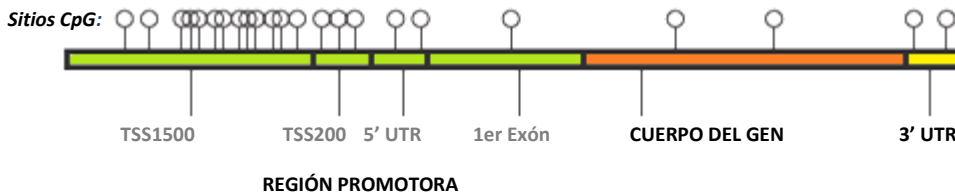


Figura 23. Clasificación de los datos de metilación según la localización genómica

Con respecto a la ubicación relativa a las islas CpG, se utilizaron los siguientes grupos: dentro de las **islas CpG**, **shores** (0-2 kb de las islas), **shelves** (>2 kb a 4 kb de la isla CpG) y **fuera de las CpGs** (denominado *open sea*) (Figura 24).

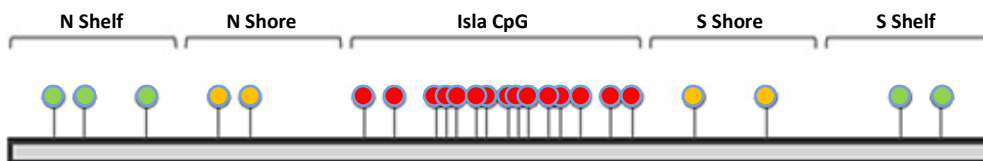


Figura 24. Clasificación de los datos de metilación según la ubicación relativa a las islas CpG

5.4.5. Secuenciación directa del ADN tratado con bisulfito

El estado de metilación del ADN de algunos genes candidatos identificados en el array de metilación (*KIAA0495*, *GDNF*, *DLEU7* y *HIST1H1A*) se confirmó mediante amplificación por PCR y secuenciación directa del ADN tratado con bisulfito (*Bisulfite Sequencing Analysis, BSA*) utilizando cebadores específicos para cada gen (Tabla 7). Los cebadores se diseñaron con los programas *MethPrimer* (<http://www.urogene.org/methprimer>) y *Methyl Primer Express v1.0* (Applied Biosystems) para amplificar regiones independientemente del estado de metilación. Por ese motivo, se diseñaron sin que contuvieran sitios CpG dentro de su secuencia, consiguiendo así, que tanto las secuencias metiladas como las no metiladas, amplificaran por igual durante la PCR.

Tabla 7. Secuencia de los cebadores para la amplificación de ADN tratado con bisulfito

Gen	Cebador Forward (5'-3')	Cebador Reverse (5'-3')	Producto PCR (pb)	Tª annealing
<i>KIAA0495</i>	TAATTAGGGAAATTTGTGGGGAGAG	ACTCCCATCTAAAAATCCACACCC	327	60°C
<i>GDNF</i>	TAGGTATTTTAAGGAAGAGATGTTTTTTT	TATTTAAAAAACCAAATCCAAACC	239	65°C
<i>DLEU7</i>	TTTGGAGAGAGGGGAAGAAGTA	CCRCRTACAAATAAAACAAC	268	60°C
<i>HIST1H1A</i>	GTTGAGGGGAGTAGGATTATAGGTT	AAAATTTCTCAAAAACAACAAAAC	280	55°C

Preparamos una mix de: 50ng de ADN tratado con bisulfito, Buffer 1x (Tampón Gold o II), dNTPS 1.25mM, MgCl₂ 1.5-2.5mM, 0.5µM de cada cebador, 0.2 U de polimerasa AmpliTaq Gold y agua hasta volumen final de 50 µl. Las condiciones empleadas para la amplificación fueron las siguientes: 95°C 10 minutos seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, 35 segundos a la temperatura de anillamiento específica (entre 55-65°C), 30 segundos a 72°C y la elongación a 72°C 10 minutos.

Los productos amplificados se purificaron y se sometieron a una reacción de secuenciación específica similar a la mencionada anteriormente pero con la siguiente modificación: 96°C durante 1 minuto, seguido de 25 ciclos de 10 segundos a 96°C y 4 minutos a 50°C. Posteriormente, las muestras se precipitaron y se analizaron en el secuenciador como se mencionó previamente.

5.5. Estudio de la metilación del gen *MGMT* (O-6-metilguanina ADN metiltransferasa)

5.5.1. Análisis del gen *MGMT* completo mediante el array de metilación

La metilación del gen *MGMT* se estudió a través de la plataforma de *Infinium Human Methylation 450 K BeadChip* (Illumina, San Diego, CA) ya que incluía 176 sitios localizados en este gen. Después del filtrado de los datos se examinaron **154 sondas**, de las cuales 25 formaban parte del promotor y 129 del

cuerpo del gen *MGMT*. Para este análisis se utilizaron los datos de 46 muestras de tumores oligodendrogliales procedentes del HVS, 124 GBM procedentes del *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) y 77 gliomas publicados en *Gene Expression Omnibus* (GEO) por Turcan y colaboradores en 2012 (30).

Para determinar el estado de metilación de cada CpG, el valor de metilación de cada muestra (β) se comparó con el valor medio de las muestras de referencia (muestras de cerebro normal). El estado metilado o no metilado de cada sonda fue asignado cuando el valor de la muestra era mayor o menor que el valor β del control, respectivamente.

5.5.2. Análisis del promotor del gen *MGMT*

Para examinar la metilación de la región promotora de *MGMT* se utilizaron las técnicas de PCR específica de metilación (MSP) y MSP cuantitativa en 68 GBMs tratados de manera estándar (quimio y radioterapia) y recogidos entre el 2003 y el 2013 en el HVS.

5.5.2.1. PCR específica de metilación (MSP)

La MSP es la técnica más utilizada para estudiar la metilación en el gen *MGMT* (70). Esta técnica permite determinar el estado de metilación de muestras de ADN previamente modificadas con bisulfito, incluyendo muestras provenientes de tejidos incluidos en parafina, mediante su amplificación y visualización posterior en geles de agarosa. El diseño de los cebadores es uno de los pasos más críticos de esta técnica, siendo necesario utilizar unos para la amplificación del alelo metilado y otros para el no metilado.

Debido a que el tratamiento del ADN con bisulfito provoca su degradación, se realizó una pre-amplificación del ADN tratado con bisulfito (Fase I). Seguidamente, se realizaron PCRs específicas para los alelos metilado y no metilado en un volumen final de 15 μ l utilizando 5 μ l del producto amplificado en la fase I (diluido 50 veces), 1X Tampón Gold de PCR, 0,2mM dNTPs, MgCl₂ 1,5 mM, 1U de AmpliTaq Gold y 0,2 μ M de los primers *forward* y *reverse* (Tabla 8):

Tabla 8. Secuencia de los cebadores para realizar la MSP de la región promotora de *MGMT*

PCR	Cebador Forward (5'-3')	Cebador Reverse (5'-3')	Producto PCR (pb)	T ^a annealing
Fase I	GGATATGTTGGGATAGTT	CCAAAAACCCCAAACCC	289	52°C
Metilado	TTTCGACGTTTCGTAGGTTTTCGC	GCACTCTCCGAAAACGAAAC	81	58°C
No metilado	TTTGTGTTTGTAGTTTGTAGGTTTTGT	AACTCCACTCTTCCAAAAACAAAACA	91	58°C

5.5.2.2. PCR cuantitativa específica de metilación (qMSP)

El estado de metilación del gen *MGMT* también se detectó mediante PCR cuantitativa basada en sondas Taqman (Figura 25) y con el ADN previamente tratado con bisulfito. Los primers utilizados se indican en la tabla 9 (96).

El ensayo cubrió una región del promotor de *MGMT* de 81pb y otra de 133pb del gen de referencia (β -actina). El volumen total de reacción fue de 20 μ l y contenía 0,2 μ M de sonda, 1 μ M de cada cebador, 1xTaqman PCR Universal Mastermix (No AmpErase UNG; Applied Biosystems, Life Technologies) y 50-100ng de ADN modificado con bisulfito. Las amplificaciones se realizaron mediante una desnaturalización inicial a 95°C durante 2 minutos, seguida de 50 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C en un equipo 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

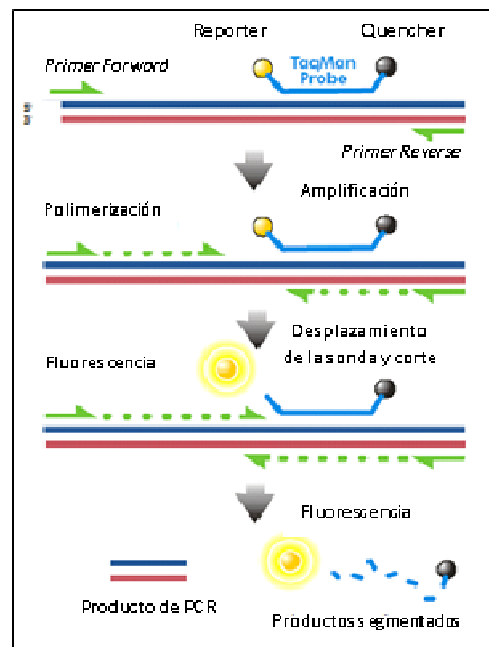


Figura 25. Las sondas Taqman están diseñadas para hibridar específicamente en la región de interés y presentan dos fluorocromos, uno en cada extremo. En el extremo 5' llevan unido de forma covalente un fluorocromo informador (reporter, FAM) y en el extremo 3' un fluorocromo amortiguador de la fluorescencia (*quencher*, TAMRA; MGB). En la fase de extensión de la PCR, y durante cada ciclo de la reacción, la actividad 5' exonucleasa de la Taq polimerasa hidroliza la sonda, desplazando al *reporter*. Este fluorocromo, cuando está lejos del *quencher*, empieza a emitir fluorescencia, la cual se mide con un fluorímetro y permite obtener el dato de Ct (número de ciclos de PCR en el cual la fluorescencia equivale al umbral de amplificación).

Las muestras se incluyeron por triplicado y se calcularon las medias de los valores Ct para cada caso. Cada experimento incluyó controles metilados y no metilados. El porcentaje de metilación se calculó para cada muestra comparando el valor medio de Ct obtenido para el gen diana (*MGMT*) con el

gen de referencia ($Ct \text{ MGMT} / Ct \beta\text{-actina}$) X 100. Se consideraron metiladas cuando la ratio $[(\text{MGMT} / \beta\text{-actina}) \times 100]$ fue inferior a la media de todas las muestras.

Tabla 9. Secuencia de los cebadores y sondas para la amplificación de *MGMT* y *β -actina*.

Gen	Cebador Forward (5'-3')	Cebador Reverse (5'-3')	Sonda
<i>MGMT</i>	TTTCGACGTTCTAGGTTTTTCGC	GCACTCTCCGAAAACGAAACG	6FAM-TGCGTATCGTTTGCG-MGB
β -actina	TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT	AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA	6FAM-ACCACCACCCAACACACAATAACAAACACA-TAMRA

5.6. Análisis de la expresión génica

Se realizó la correlación de los datos de metilación y de expresión génica de mRNA mediante la utilización de los datos de expresión génica de 25 tumores oligodendrogiales (véase tabla 5) obtenidos previamente en el laboratorio.

5.6.1. Análisis de expresión génica mediante microarrays

La plataforma empleada para hibridar el ARN total de las muestras fue *Human 44K whole-genome oligonucleotide microarrays* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) que permitió analizar la expresión de 44.290 sondas del genoma. Los datos brutos se encuentran publicados en la base de datos GEO con número de acceso GSE27005.

La normalización de los datos de expresión génica y la eliminación del posible ruido de fondo, se realizó mediante la herramienta *DNMAD (Diagnosis and Normalization of Microarray Data)* con el método *print-tip loess*. Tras el preprocesado, los datos se transformaron a escala logarítmica en base 2 (\log_2) con el paquete GEPAS v4.0 (<http://gepas.bioinfo.cipf.es/>), para su posterior análisis. Además, se eliminaron los genes duplicados ajustando su valor a la mediana, obteniendo un único valor para cada uno de ellos. Por otro lado, se utilizó la herramienta de *Gene ID Conversion (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, DAVID)* para la conversión de las referencias de los genes de las distintas plataformas a un identificador común.

Para el análisis de estos datos se calcularon las medias entre muestras para formar los grupos de interés y se determinó el *fold change*, es decir, cuántas veces por encima o por debajo se expresaba el gen de interés frente a la referencia utilizada. Para cada una de las comparaciones se evaluó su significación estadística (véase apartado 2.9).

5.6.2. Análisis de expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)

Para estudiar los niveles de expresión de los genes más relevantes identificados mediante el array de expresión génica realizamos una PCR cuantitativa a tiempo real utilizando el ADN copia (ADNc), sintetizado a partir del RNA obtenido de 22 tumores oligodendrogiales: 12 diagnosticados de OD (10 de grado II, 2 grado III) y 10 diagnosticados de OA, incluyendo 5 grado II y 5 grado III. Además, se utilizaron como controles 2 muestras de CN procedentes de autopsias.

5.6.2.1. Síntesis de ADNc

La transcripción reversa para sintetizar ADN complementario a partir de ARN total (2µg) se realizó mediante el Kit *High Capacity RNA-to-cDNA* (Applied Biosystems) utilizando random hexamers y una retrotranscriptasa inversa que se incubó a 37°C durante 60 minutos seguido de 5 minutos a 95°C para detener la reacción. Únicamente se incluyeron en el estudio los casos que mostraban en el gel de agarosa al 2% una banda nítida.

5.6.2.2. Plataforma qRT-PCR

El estudio de expresión génica se realizó en las *Custom Taqman array plates* mediante qRT-PCR basada en sondas Taqman (apartado 2.5.2.2), permitiendo el análisis de expresión de 11 genes de interés más un control de fabricación (18S rRNA) y 3 controles endógenos (*GAPDH*, *GUSB* y *HPRT1*). Se realizó una mezcla de 5µl *TaqMan® Fast Universal Master Mix (2x)*, *No AmpErase® UNG* (Applied Biosystems) y 1µl de ADNc en un volumen final de 10 µl. Los cebadores y sondas para la amplificación específica de cada gen se encontraban liofilizados en la placa y fueron los siguientes (Tabla 10):

Tabla 10. Sondas Taqman utilizadas para el estudio de expresión génica (Applied Biosystems).

Identificador específico para cada uno de los genes analizados			
TSG101: Hs01121709_m1	TRIP4: Hs00249373_m1	FNBP1L: Hs00214700_m1	DRG2: Hs00169912_m1
FBXO42: Hs00398587_m1	KIAA0495: Hs00390315_m1	MOXD1: Hs01026921_m1	ENC1: Hs00171580_m1
PTPRF: Hs00892965_m1	DRAM1: Hs00218048_m1	RIOK2: Hs00217900_m1	

Esta reacción se llevó a cabo en el *7500 Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones de amplificación: 2 minutos a 50°C, 20 segundos a 95°C y 40 ciclos de 95°C durante 3 segundos y por último 30 segundos a 60°C. Todas las muestras se incluyeron por triplicado.

5.6.2.3. Análisis de los datos de qRT-PCR

Para el análisis de los datos obtenidos se realizó una cuantificación relativa, determinando, en cada una de las muestras, la relación entre el gen problema y el gen de referencia (*GAPDH*). Además, el valor normalizado se comparó con el de una muestra calibradora (en este caso de tejido no tumoral).

Por lo tanto, el método a seguir para la cuantificación relativa de los niveles de expresión fue el de $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, realizado con los siguientes pasos:

$$1) Ct \text{ gen problema} - Ct \text{ gen endógeno} = \Delta Ct \text{ muestra tumoral}$$

$$Ct \text{ gen calibrador} - Ct \text{ gen endógeno} = \Delta Ct \text{ tejido normal}$$

$$2) \Delta Ct \text{ muestra tumoral} - \Delta Ct \text{ tejido normal} = \Delta\Delta Ct$$

Una vez obtenido el valor de RQ, para realizar las posteriores comparaciones entre los grupos de interés, se calculó la media y la desviación estándar de las muestras y se estudió si las diferencias eran estadísticamente significativas (véase apartado 2.9).

5.7. Análisis de expresión proteica mediante técnicas inmunohistoquímicas

5.7.1. Matrices de tejido o TMA

Las matrices de tejido son bloques de parafina en los cuales se incluyen cilindros separados de distintas muestras, lo que permite el análisis simultáneo de múltiples casos. Previamente a la realización de la matriz es importante seleccionar un área representativa de cada tumor a partir de un corte de la muestra teñido con hematoxilina-eosina.

Para la construcción de las matrices se utilizó un *Tissue Microarray*, obteniendo cilindros de 1mm de diámetro de tejido incluido en parafina de las muestras de interés (bloque donador). Los cilindros se colocaron de forma ordenada en un bloque de parafina nuevo (bloque receptor). Seguidamente, se realizaron cortes de 2.5µm con el micrótopo y se colocaron en portaobjetos para el posterior análisis inmunohistoquímico (Figura 26).

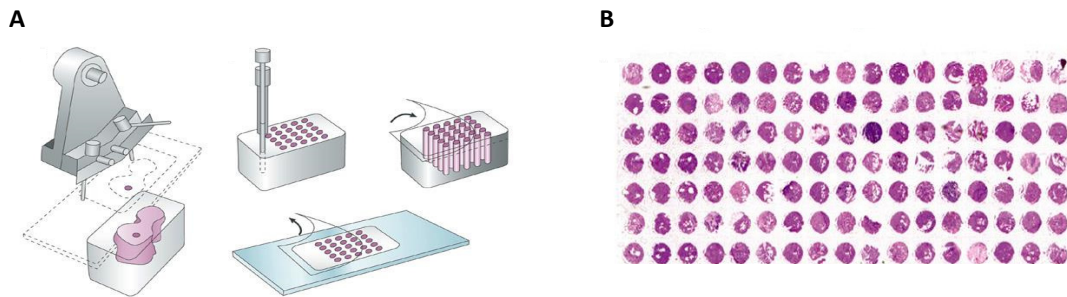


Figura 26. Realización de una matriz de tejido (TMA) para permitir el análisis simultáneo de muestras. **A:** Obtención de secciones cilíndricas de tejido incluido en bloques de parafina (bloque donador) mediante un *tissue microarrayer*, y construcción del TMA colocando estos cilindros en un bloque aceptor de parafina vacío. **B:** Sección de una matriz de tejido teñida con hematoxilina y eosina.

5.7.2. Tinción inmunohistoquímica

Se realizaron **10 TMAs** para la valoración de la expresión de la proteína mutada IDH R132H, y la expresión de las proteínas p53 y ATRX en un total de **272 gliomas** (véase Tabla 5: Caracterización molecular). La desparafinación de los cortes se realizó de manera similar a lo que se ha mencionado para la técnica FISH. El desenmascaramiento antigénico por calor se realizó en olla a presión a 95°C en una solución de tampón citrato (10mM, pH=6) o tampón EDTA (1mM, pH=8). Después, se realizó el tratamiento enzimático con proteínasa K para la adecuada permeabilización del tejido. Seguidamente, se produjo la inactivación de la peroxidasa endógena con solución bloqueante de agua oxigenada durante 10 minutos (*Peroxidase Blocking Reagent Ready-to-Use*, Dako).

Tras el desenmascaramiento y la inhibición de la peroxidasa endógena se incubó con el anticuerpo primario diluido de interés en un diluyente comercial (*ChemMate Antibody Diluent*, Dako). Las condiciones de incubación y las diluciones fueron las requeridas para cada uno de los anticuerpos. Seguidamente, para la inmunodetección, se incubó con un anticuerpo secundario universal (coctel de inmunoglobulinas de distintas especies animales que permite utilizarlos frente a distintos anticuerpos primarios) que incluía un polímero de dextrano ligado a peroxidasa (*EnVision™ Detection Systems Peroxidase/DAB*, Dako). Transcurrido el tiempo de incubación, se lavaron con PBS 1x durante 5 minutos, se contra tiñeron con hematoxilina y se deshidrataron en pases de etanol y finalmente, en xilol. Todas las tinciones inmunohistoquímicas se llevaron a cabo en el sistema automatizado *EnVision FLEX/HRP Technique* (Dako).

Para los distintos estudios se seleccionaron una serie de anticuerpos primarios frente a las proteínas de interés que se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Anticuerpos primarios empleados para estudiar la expresión proteica

Proteína de interés	Anticuerpo	Tinción	Dilución	Fabricante
ATRX	HPA001906	Nuclear	1:100	Sigma Aldrich
p53	D07	Nuclear	-	Dako
IDH1 R132H	H09	Citoplasmática	1:200	Dianova GmbH

Se realizó el análisis de la expresión proteica de los diferentes marcadores teniendo en cuenta si la tinción era nuclear o citoplasmática. Se consideró **p53-positivo** cuando la tinción se observaba en más del **50%** de las células tumorales, en cambio, para **ATRX** e **IDH1 R132H**, cuando se expresaban en más del **10%** de las células tumorales.

5.8. Validación de los resultados utilizando bases de datos externas

5.8.1. Validación de los perfiles de metilación global

Para validar los resultados de metilación obtenidos en nuestra serie, se recogieron datos de metilación realizados con la misma plataforma (Illumina HM 450K), de las bases de datos **TCGA** y **GEO**. Para la homogeneización de los datos procedentes de GEO, éstos se transformaron mediante la función inversa del logaritmo (expit). Se incluían para la validación un total de **203 muestras**, 77 gliomas de la serie GSE30338 (31 OD, 6 OA, 31 AD y 9 GBM) y 126 GBM del TCGA.

5.8.2. Validación de los resultados de expresión

La validación de los resultados de expresión génica se llevó a cabo a partir de los datos de expresión de una serie externa de **48 gliomas** (3 OA, 26 OD y 19As) realizados con la plataforma de *Affymetrix GeneChip Human Genome U133 2.0* (Turcan et al). Esta plataforma incluía **22.277 sondas** y los datos se obtuvieron de la base de datos GEO (número de serie GSE30336).

5.8.3. Validación de la metilación en el gen *MGMT*

Para la validación de los resultados de metilación de *MGMT* y su posible papel pronóstico se analizaron los datos de metilación global (HM-450K y HM-27K) de **115 gliomas anaplásicos** (77 OD and 38 OA) incluidos en el ensayo EORTC-26951 (GSE48462) (97). Además, se utilizaron los datos de metilación de *MGMT* de **166 pacientes con GBM primarios** e *IDH* wild-type de un estudio realizado por Mulholland et al., 2012, donde se examina la metilación del gen *MGMT* mediante pirosecuenciación, MSP y qMSP (98).

5.9. Análisis estadísticos y funcionales

Para determinar la significación estadística de las diferencias observadas entre grupos se realizó el **t-test** o la prueba exacta de Fisher. El umbral de significación estadística se estableció en **p-valor < 0,05**. En los estudios de microarrays de metilación o expresión se consideró **q-valor < 0,05** calculado por el método de *Benjamini-Hochberg*, siendo el q-valor análogo al *Fold discovery rate* (FDR).

Los **análisis de componentes principales** (PCA) y los **agrupamientos jerárquicos** (Hierarchical clustering) –no supervisados y supervisados– se llevaron a cabo para ver la distribución y clasificación de las muestras. Estos análisis estadísticos se realizaron con el programa *Qlucore Omics Explorer* (Qlucore AB, Lund, Suecia).

Por otro lado, se utilizaron curvas de supervivencia de **Kaplan-Meier** para estimar la distribución de la supervivencia y se empleó la prueba *log-rank* para establecer la significación estadística. Además, el análisis multivariante de la supervivencia global se realizó mediante la **regresión de Cox**, con el método por pasos hacia adelante para obtener los valores de p y *hazard ratios* (HR). En este caso, se consideró estadísticamente significativo $p < 0,05$. Por último, para determinar la asociación entre los diferentes parámetros se utilizó el coeficiente de correlación de *Spearman*. Todas estas pruebas se generaron con el programa *SPSS v18.0* (Statistical Package for the Social Sciences) (SPSS, Chicago, IL) o *Pomelo II* (www.pomelo2.bioinfo.cnio.es).

La **relevancia funcional y biológica de los genes** se analizó utilizando las bases de datos *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID), *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) y *GeneCards v3*.

RESULTADOS

RESULTADOS

6. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LA SERIE

Las muestras de **272 pacientes** recogidos para realizar este estudio incluían diferentes subtipos y grados de gliomas: 68 OD (grado II: 39, grado III: 29), 40 OA (grado II: 23, grado III: 17), 56 As (grado II: 34, grado III: 22) y 108 GBM. Se obtuvo la información clínica de 252 pacientes, de los cuales 155 fueron hombres y 109 mujeres, con una edad media de 52 años y una supervivencia global media de 42 meses (3,5 años) (Tabla 12).

Tabla 12. Resumen de las características clínicas de los 272 pacientes.

	OD II	OD III	OA II	OA III	A II	A III	A IV (GBM)	Total
Nº pacientes	39	29	23	17	34	22	108	272
Edad media (rango), años	40 (23-59)	49 (23-78)	44 (24-70)	51 (21-78)	42 (21-78)	51 (26-70)	62 (24-82)	52
Hombre/ Mujer*	25/14	13/16	16/7	8/9	16/11	10/11	67/41	155/109
Media SG (rango), meses	207 (2-305)	136 (3-256)	134 (4-206)	71,5 (5-208)	90,7 (2-135)	39,9 (1-101)	14,5 (1-75)	41.9
Vivo/Muerto*	28/7	13/10	15/8	5/10	19/9	8/13	11/96	99/153

*No estaban todos los datos disponibles

7. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS GLIOMAS

En este estudio se analizó la expresión de la proteína mutante R132H IDH1, así como la mutación de los genes *IDH1/2*, la pérdida combinada de 1p/19q y la translocación t(1;19)(q10;p10), la expresión de las proteínas p53 y ATRX y el alargamiento telomérico (ALT). Los resultados obtenidos se detallan a continuación en función del marcador utilizado.

7.1. Mutación de *IDH1* e *IDH2*

En el análisis de las alteraciones moleculares de los genes *IDH1* e *IDH2* se detectó una **alteración en dichos genes** en el **43,2%** de los casos (112/259), presentando 106 tumores mutación en el gen *IDH1*, 61 de ellos detectados por secuenciación directa (previamente detectados por HRM y confirmados por

secuenciación) y 45 mediante el análisis de la expresión de la proteína mutante IDH1 R132H (clon H09). Otros 6 casos tenían mutado el gen *IDH2* (Figura 27) (Tabla 14).

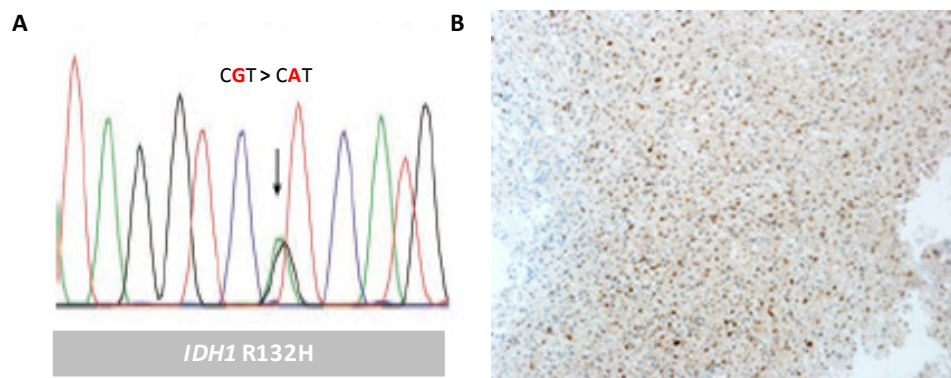


Figura 27. Tumor con la **mutación p.R132H del gen *IDH1*** (A) identificada por secuenciación directa y (B) por IHQ

Para el **gen *IDH1*** la mutación detectada de manera más frecuente fue el cambio de guanina por adenina (c.395G>A) produciendo un cambio de aminoácidos (arginina por histidina) en el codón 132 (p.R132H) (88,5%; 54 casos), aunque también se identificaron otras alteraciones adicionales en ese mismo codón como p.R132G (c.394C>G; 4,9%), p.R132S (c.394C>A; 3,2%), p.R132C (c.394C>T; 1,6%) y p.R132L (c.395G>T; 1,6%). Además, en los casos con mutación detectada por inmunohistoquímica (IHQ) se confirmó la mutación de *IDH1* p.R132H mediante secuenciación directa (91,8%), sin embargo hubo 3 casos con expresión de la proteína aberrante de IDH1 en los que no se detectó la mutación en el codón 132 mediante secuenciación Sanger.

Por otro lado, la mutación más frecuente en el **gen *IDH2*** se produjo en el codón 172 (substitución de guanina por adenina), provocando un cambio de arginina por lisina (p.R172K) y detectándose en el 66,6% de los casos mutados (n=4). También se identificó la mutación c.515A>T (p.R172W; arginina-triptófano) en dos casos.

Los subtipos histológicos que presentaban más frecuentemente la alteración en los genes *IDH1/2* fueron astrocitomas difusos (A II, 81,5%) y tumores oligodendrogiales (TO) de grados II y III (83% OD y 68% OA), mientras los A de grado III y GBMs presentaban frecuencias más bajas (36% y 1,8%, respectivamente). Esta mutación fue más frecuente en tumores de bajo grado que en los de alto grado (74/87 casos grado II; 85% frente a 38/172 de grado III; 22%) ($P < 0,0001$) (Figura 28). Además, los pacientes con tumores *IDH* mutado (*IDH* mut) fueron significativamente **más jóvenes** que aquellos que tenían *IDH* nativo (41,5 años frente a 59,2 años) ($P < 0,05$) (Figura 29) (Tabla 14).

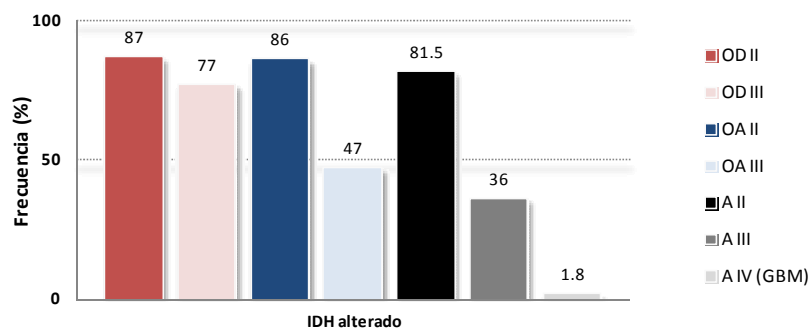


Figura 28. Distribución de la mutación en los genes *IDH1/2* de acuerdo al subtipo histológico.

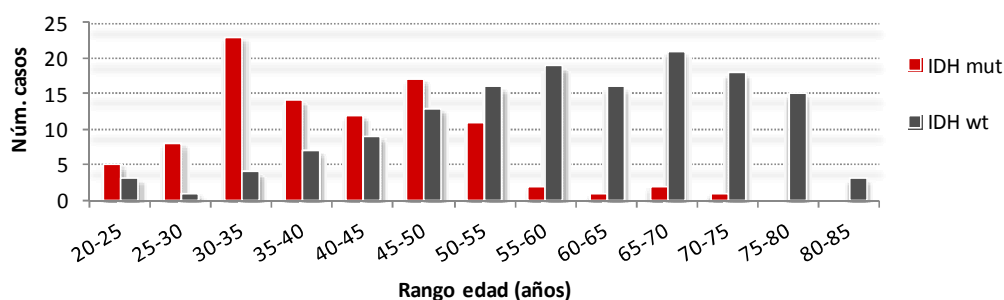


Figura 29. Distribución de la mutación en los genes *IDH1/2* de acuerdo a la edad.

7.2. Pérdida combinada de 1p/19q y translocación t(1;19)(q10;p10)

La **pérdida combinada de 1p/19q** se identificó en 47 casos de 101 tumores analizados con componente oligodendroglial (**46,5%** de los gliomas) (Figura 30 y 31). La codeleción de 1p/19q se detectó en el 74 y 73% de los OD puros de bajo y alto grado, respectivamente (Tabla 14). Sin embargo, la frecuencia de esta alteración en los tumores mixtos no fue tan elevada: 18% en OA grado II y 25% en OA III (29 OA analizados) (Figura 30).

Por otro lado, la pérdida combinada de 1p/19q solo se estudió en astrocitomas cuando las muestras presentaban histológicamente un componente oligodendroglial, sin detectarse en ningún caso. Además, no hubo diferencias en la edad de los pacientes de acuerdo al estado de 1p/19q (media de 43,9 para los codelecionados frente. 45,5 años los 1p/19q intacto).

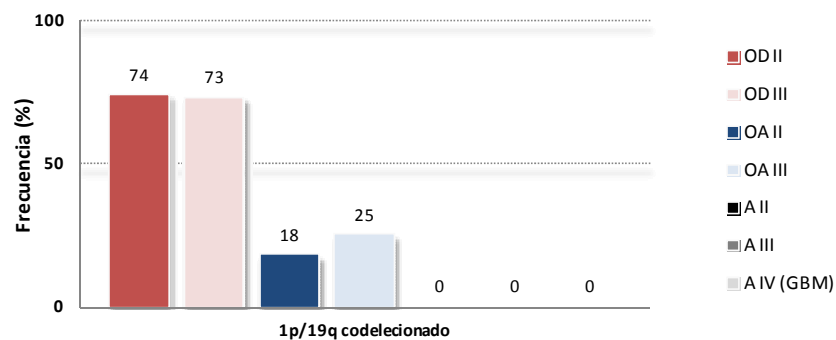


Figura 30. Distribución de la pérdida combinada de 1p/19q de acuerdo al subtipo histológico.

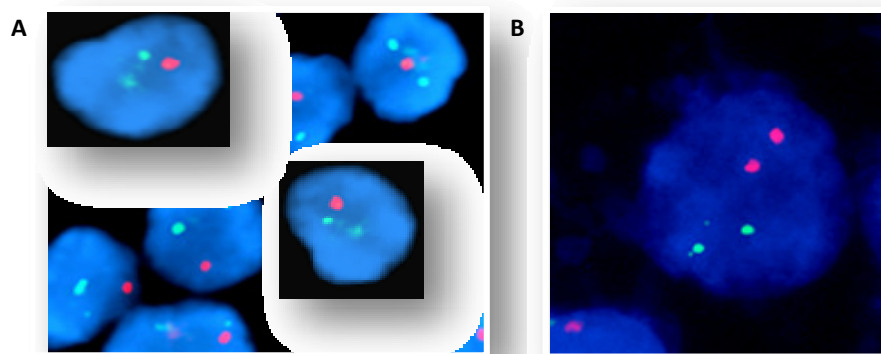


Figura 31. (A) Oligodendroglioma con **codelección en 1p/19q** detectada por FISH (2 señales verdes y 1 roja). Se muestra la pérdida del brazo cromosómico 1p. (B) Célula con el brazo cromosómico 1p normal (2 señales verdes y 2 rojas).

Debido a que en ocasiones la presencia de la pérdida en 1p/19q no era evidente, se analizó la presencia de la **translocación t(1;19)(q10;p10)**, que se ha descrito como el mecanismo previo a la pérdida (Robert B. Jenkins et al.).

Para ello, se estudió la translocación en 13 tumores oligodendrogliales (TO) (4 OA II, 5 OA III, 3 OD II y 1 OD III), de los cuales 4 tenían la codelección de 1p/19q en un 40-90% de las células y los otros 9 no presentaban la pérdida combinada de 1p/19q (en estos casos la pérdida de 1p ó 19q se detectó en el 15-25% de las células). Debido a que la región centromérica del cromosoma 19 está compuesta por secuencias repetitivas y muy homólogas con la secuencia centromérica del cromosoma 1 y del centrómero del cromosoma 5, se realizó el ensayo con diversos BACS situados en la zona pericentromérica del cromosoma 19. La co-localización de las sondas de fusión α -satelite CEP1 (rojo) con los BACS situados en 19p12 (verde) en al menos un 50% de las células analizadas, fue el criterio utilizado para considerar que las muestras presentaban la translocación t(1;19)(q10;p10) (Figura 33).

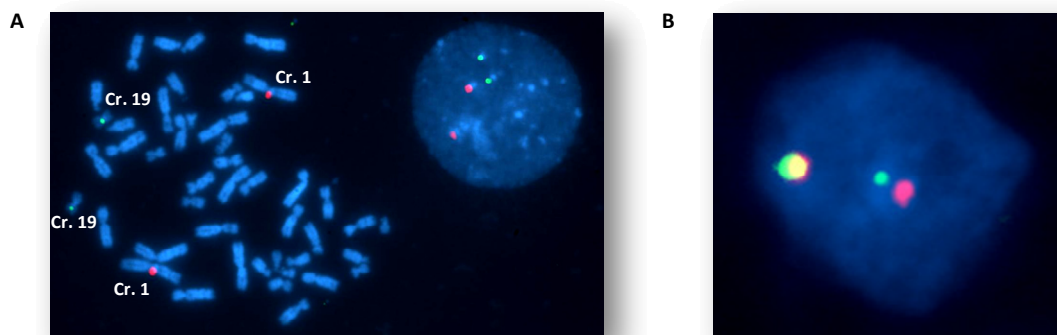


Figura 33. (A) Muestra control donde se observa la translocación negativa entre el centrómero del 1 y la región 19q12, tanto en metafase como en interfase. **(B)** Célula de un tumor oligodendroglial positivo para la $t(1;19)(q10;p10)$.

La validación inicial de la sonda se realizó en una muestra de linfocitos de sangre periférica, donde se observó el correcto marcaje de las sondas, la correcta localización y su calidad. Posteriormente, se realizó la hibridación de estas sondas en las muestras, detectando únicamente 3 casos positivos para la translocación $t(1;19)(q10;p10)$, las cuales presentaban además la codeleción de $1p/19q$ (2 ODs puros y un OA). Sin embargo, no se observó la translocación en ninguno de los 9 tumores oligodendrogliales sin pérdida combinada de $1p/19q$, a pesar de que el análisis de la codeleción permitió detectar pérdida de ambos cromosomas en un 15-25% de las células analizadas. Por otra parte, tampoco se identificó la translocación en un OD grado II con codeleción de $1p/19q$ previamente identificada por FISH.

7.3. Expresión de la proteína ATRX

Se detectó la ausencia de **expresión nuclear de la proteína ATRX** en 51 casos de los 272 (**18,75%**) (Tabla 14). Ésta fue más frecuente en los As grado II (19/34, 56%) y III (7/22, 32%) y en los OA de grado II (12/23, 52%) y III (7/17, 41%) que en los OD puros de grados II y III (10,3% y 3,4%; respectivamente) o en los GBMs (1%) ($P < 0,0001$) (Figura 34 y 35). La ausencia de expresión de ATRX se detectó mayoritariamente en tumores de bajo grado (68,7%, 35/31). Por otra parte, los pacientes con pérdida de expresión de la proteína ATRX fueron significativamente más jóvenes (media de 38 años) que aquellos que expresaban ATRX (55 años) $P = 0,0001$ (Figura 36).

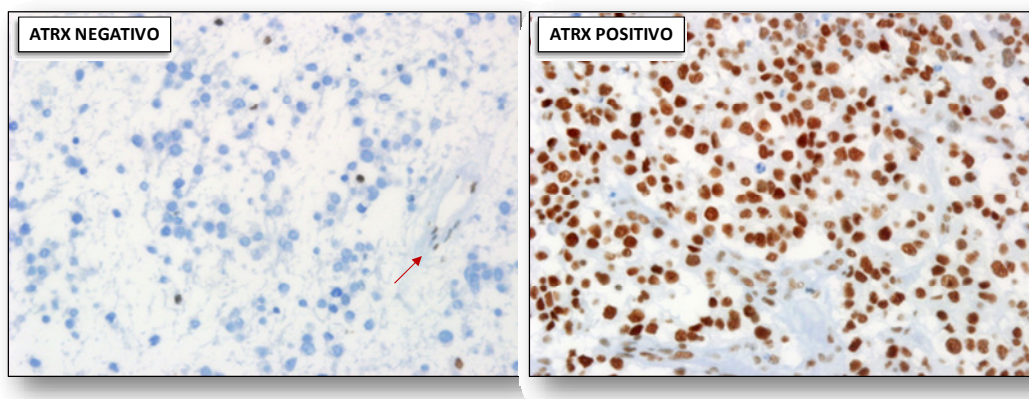


Figura 34. Expresión proteica de ATRX. Imágenes capturadas con un objetivo de 40x. La imagen de la izquierda corresponde a un caso con **pérdida de expresión de ATRX**. La flecha roja muestra que las células endoteliales son positivas (control interno). A la derecha un caso con **expresión nuclear de ATRX**.

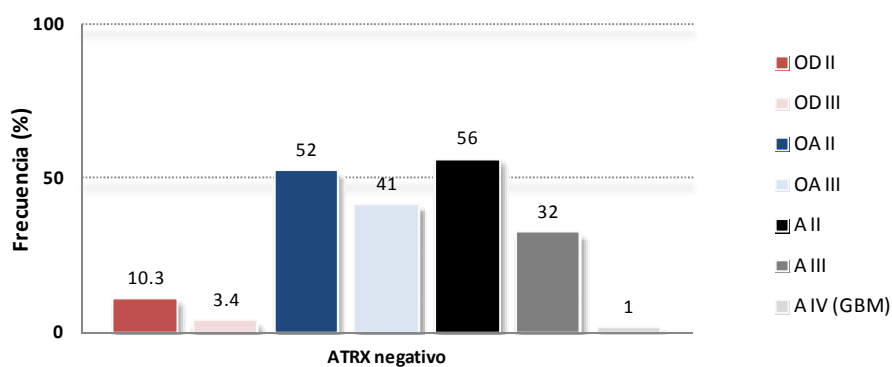


Figura 35. Distribución de la pérdida de expresión de ATRX de acuerdo al subtipo histológico.

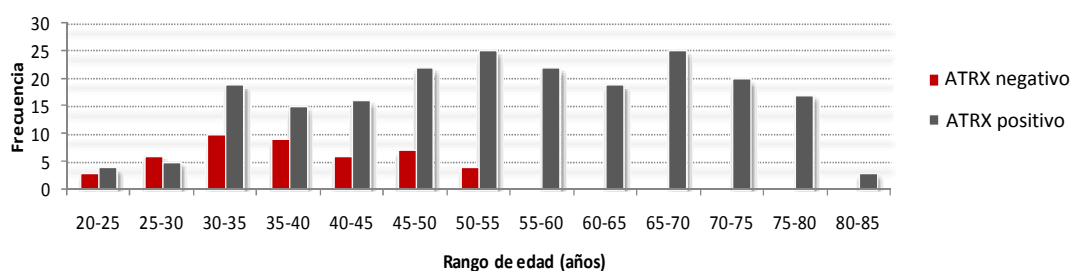


Figura 36. Distribución de la expresión de la proteína ATRX de acuerdo a la edad. Los pacientes con pérdida de expresión de ATRX eran más jóvenes que los pacientes con tumores ATRX positivos.

7.3.1. Alargamiento telomérico (ALT)

Debido a que la ausencia de expresión de ATRX se ha correlacionado con el alargamiento de los telómeros en tumores neuroendocrinos de páncreas (PanNETs) (Christopher M Heaphy *et al.*, 2011), se realizó el estudio del **alargamiento de los telómeros** con sondas específicas mediante FISH en 47 casos

de la serie, seleccionando casos con y sin expresión de la proteína ATRX (Figura 37). Se observó ALT positivo en 22 gliomas (47%), siendo en su mayoría tumores bajo grado (75%). Ninguno de los GBM en los que se analizó esta alteración presentaba ALT (0/13) (Tabla 14). Además, se detectó la ausencia de expresión de la proteína ATRX en 21 de los 22 casos con ALT (95,5%).

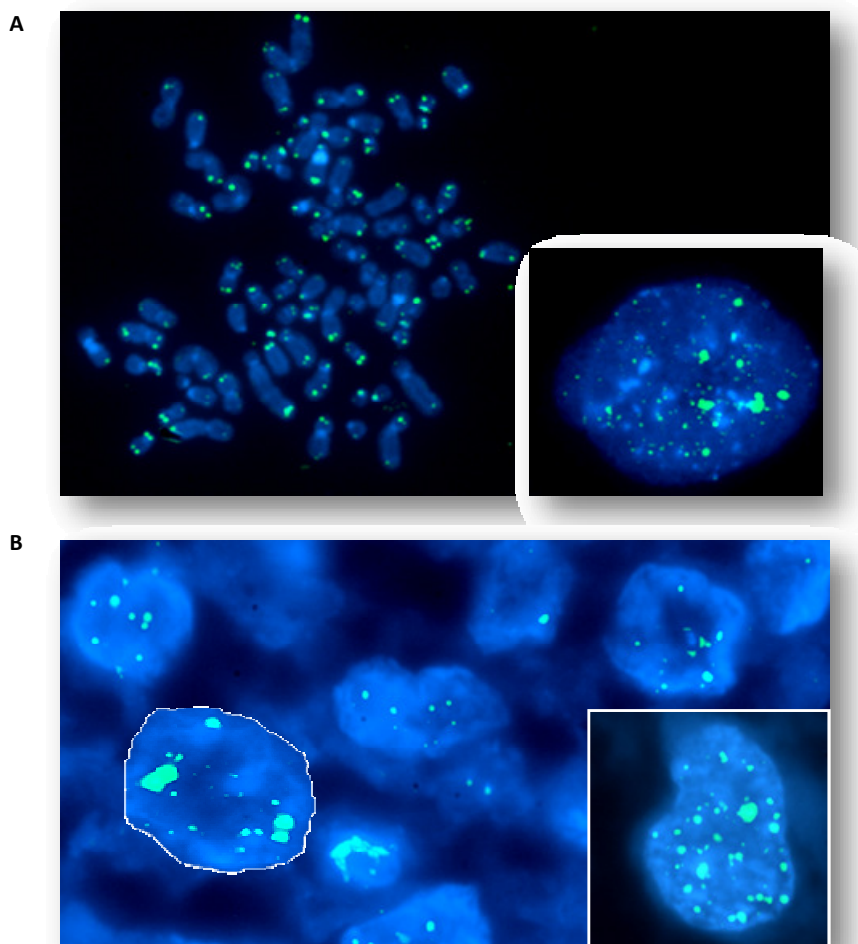


Figura 37. (A) Cariotipo realizado en la línea celular U2OS como control positivo de alargamiento telomérico mediante FISH con sondas PNA. (B) Células en interfase de un caso con alargamiento telomérico (100x).

7.4. Mutación de TP53 y expresión de la proteína p53

En esta serie, la **sobreexpresión nuclear de p53** se observó en un total de 85 muestras (33,9%), siendo mayoritaria en A y OA de grado II y III (del 47 al 57%), mientras fue poco frecuente en OD puros de grado II y III (17 y 11%, respectivamente) (Tabla 14). Los GBM presentaron expresión nuclear de p53 en 34 de los 108 casos (31,5%) (Figura 38 y 39). No hubo diferencias significativas en la distribución de esta alteración con respecto al grado tumoral. Por otro lado, a pesar de que los pacientes con tumores

con expresión de p53 fueron más jóvenes que los que presentaban baja expresión (48,6 años vs. 54,3 años), estas diferencias tampoco fueron significativas.

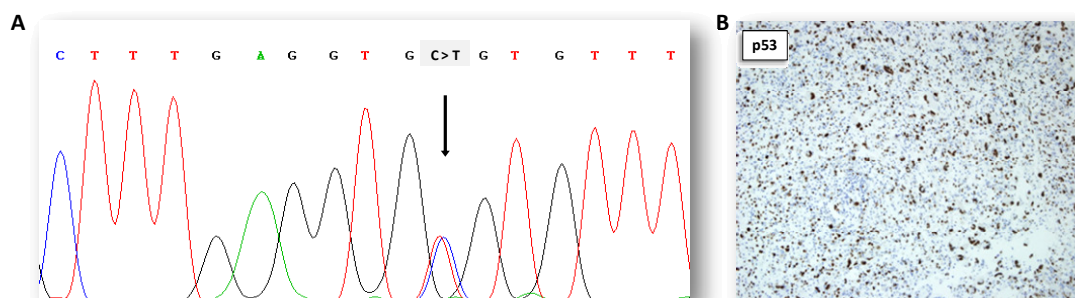


Figura 38. (A) Mutación en el exón 8 de TP53 (p.R273C) identificada por secuenciación directa y (B) sobreexpresión nuclear de la proteína p53 (40x)

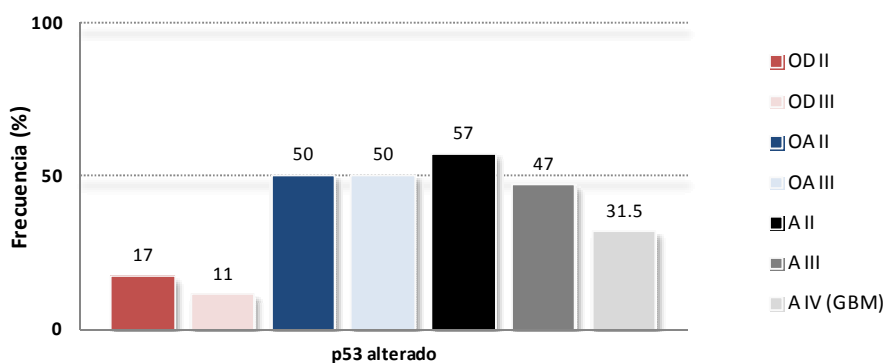


Figura 39. Distribución de la sobreexpresión de p53 de acuerdo al subtipo histológico.

Además, se estudió la presencia de mutaciones en los exones 5, 6, 7 y 8 del gen TP53 en 46 TOs, 8 de los cuales tenía sobreexpresión de la proteína p53, para analizar la correlación de la sobreexpresión de p53 con mutaciones en el gen. Se identificó TP53 mutado (en alguno de los cuatro exones) en 7 casos (5 OA y 2 OD de alto grado), en 5 de los cuales se había detectado previamente su sobreexpresión (Tabla 13). Por lo tanto, hubo una correlación del 71,4% entre las mutaciones en TP53 y la sobreexpresión de la proteína.

Tabla 13. Siete mutaciones detectadas en los exones 5, 6, 7 y 8 del gen TP53 (NM_001126114)

Exón TP53	Mutación AA	Mutación cDNA	Exón TP53	Mutación AA	Mutación cDNA
5	p.P191del	c.572_574delCTC	7	p.Y234C	c.701A>G
6	p.R213*	c.637C>T	8	p.R273H	c.818G>A
7	p.G244S	c.730G>A	8	p.R273C	c.817C>T
7	p.S260Y	c.779C>A			

7.5. Resumen de las alteraciones moleculares analizadas

En la siguiente tabla se resumen las alteraciones moleculares analizadas en esta serie en función del subtipo histológico: mutación de los genes *IDH1/2*, pérdida combinada de 1p/19q, la expresión de las proteínas p53 y ATRX y el alargamiento telomérico (ALT).

Tabla 14. Resumen de las características moleculares de los 272 pacientes.

Diagnóstico	<i>IDH</i> alterado*	1p/19q codeleción*	p53 alterado*	ALT positivo*	ATRX negativo
OD II (N=39)	34/39 (87%)	25/34 (74%)	6/35 (17%)	2/3 (66,6%)	4/39 (10,3%)
OD III (N=29)	20/26 (77%)	16/22 (73%)	3/27 (11%)	3/4 (75%)	1/29 (3,4%)
OA II (N=23)	18/2 (86%)	3/17 (18%)	10/20 (50%)	8/10 (80%)	12/23 (52%)
OA III (N=17)	8/17 (47%)	3/12 (25%)	8/16 (50%)	4/10 (40%)	7/17 (41%)
A II (N=34)	22/27 (81,5%)	0/11 (0%)	16/28 (57%)	5/7 (71,4%)	19/34 (56%)
A III (N=22)	8/22 (36%)	0/4 (0%)	8/17 (47%)	-	7/22 (32%)
A IV (GBM) (N=108)	2/108 (1,8%)	-	34/108 (31,5%)	0/13 (0%)	1/108 (1%)
Total	112	47	85	22	51

*No estaban todos los datos disponibles

7.6. Clasificación molecular basada en el estado mutacional de *IDH*, codeleción de 1p/19q y expresión de ATRX

Los **casos con codeleción en 1p/19q**, todos ellos tumores oligodendrogiales (73,5% OD y 21,5% OA), presentaron también alteración (expresión y/o mutación) en los genes *IDH1/2* (46/47; 97,9%). En cambio, la mayoría de ellos no expresaban la proteína p53 (91% de los casos) pero sí la proteína ATRX (100%). Por otro lado, en esta serie, la mayoría de los tumores con **ausencia de expresión de ATRX** tenían *IDH* mutado (41 de 48 muestras con pérdida de ATRX, 85,5%), expresión de p53 positiva (35/48, 72,9%) y 1p/19q intacto (25/25), siendo en su mayoría tumores astrocitarios de grado II y III. Por último, los casos que tenían ***IDH1/2* no mutado o wild-type** (147), mayoritariamente GBM (68,7%), tampoco presentaron alteraciones en el estado de los cromosomas 1p y 19q (0,7%), ni en la expresión de ATRX (4,7%). La sobreexpresión de la proteína p53 se observó en un 33,3% de estos casos.

El coeficiente de correlación de Spearman, mostró la fuerte asociación ($P < 0,0001$) entre la ausencia de expresión de ATRX con la mutación de *IDH* ($\rho=0,41$), la expresión positiva de p53 ($\rho=0,40$) y ALT positivo ($\rho=0,91$). Mientras, la codeleción de 1p/19q fue mutuamente excluyente con la pérdida de expresión de ATRX ($\rho=-0,51$).

Debido a que se observó una fuerte correlación entre las diferentes variables moleculares y que estas además parecían ser características de un subtipo histológico concreto, se realizó una **clasificación molecular**, basada en el estado mutacional de *IDH*, la expresión de ATRX y el estado de 1p/19q. En base a los marcadores moleculares mencionados pudimos clasificar 235 tumores en cuatro grupos (Tabla 15 y Figura 40).

Tabla 15. Clasificación molecular de 235 tumores basada en el estado mutacional de *IDH*, la codeleción de 1p/19q y la expresión de la proteína ATRX. Se refleja el número de muestras en cada grupo y en paréntesis el porcentaje que supone del total (N) de cada grupo.

GRUPOS MOLECULARES	GRUPO I-CD N=46	GRUPO I-A N=38	GRUPO I N=16	GRUPO SA N=135
GBM	0 (0)	0 (0)	2 (12,5)	104 (77,04)
A III	0 (0)	6 (15,79)	2 (12,50)	13 (9,63)
A II	0 (0)	16 (42,11)	6 (37,50)	4 (2,96)
OA III	2 (4,35)	4 (10,53)	0 (0)	5 (3,70)
OA II	3 (6,52)	8 (21,05)	3 (18,75)	2 (1,48)
OD III	16 (34,78)	1 (2,63)	0 (0)	5 (3,70)
OD III	25 (54,35)	3 (7,89)	3 (18,75)	2 (1,48)
Edad media (rango), años	43,9 (23-78)	39,2 (21-55)	40,8 (28,2-71,5)	60,7 (24-82)
Mediana SG (rango), meses	179,5 (152-207)	117 (87,4-149)	82,7 (49-116,3)	10,63 (6,6-14,6)

En primer lugar, se identificó un grupo de tumores con mutación de *IDH*, codeleción de 1p/19q y expresión de ATRX, al que asignamos el nombre de "**grupo molecular 1 (I-CD)**". Este grupo se componía sobretodo de ODs (89%, 41/46) y de tumores de grado II (61%, 28/46). En este grupo, no se detectó expresión de la proteína p53 en la mayor parte de los casos (87%, 40/46) (Tabla 15 y Figura 40).

El "**grupo molecular 2 (I-A)**" (38 pacientes) se caracterizó por tumores con mutación de *IDH*, 1p/19q intacto y ausencia de expresión de ATRX. Las alteraciones moleculares características de este grupo (mutación de *IDH* y ausencia de expresión de ATRX) se encontró frecuentemente en tumores con componente astrocitario (89%, 22 As grado II-III y 12 OA de grado II-III) y en bajo grado (71%, 27/38). También se detectó una elevada frecuencia de expresión de p53 en este grupo (71,4%, 25/35 casos).

Una tercera serie de 16 pacientes, "**grupo molecular 3 (I)**", presentaba como única alteración la mutación de *IDH*, no detectándose la codeleción de 1p/19q ni ausencia de expresión de la proteína ATRX. Estos pacientes incluían diferentes diagnósticos (2 GBM, 8 As II/III, 3 OA y 3 OD), mayoritariamente de grado bajo (75%, 12/16) y con expresión de p53 (67%, 8/12) (Tabla 15).

Por último, se clasificó un grupo de 135 pacientes como "**grupo molecular 4 (sin alteraciones, SA)**" ya que se caracterizaban por tener *IDH* wild-type, 1p/19q intacto y expresión de ATRX, con ausencia de expresión de p53 en un 68% de los casos (87/128). El diagnóstico histológico mayoritario fue el de GBM (78,8%; 104/135), aunque también se encontraba algún tumor de grado II y casos con un componente oligodendroglial (23 y 8, grado III y grado II, respectivamente; y 7 OA y 7 OD) (Figura 40).

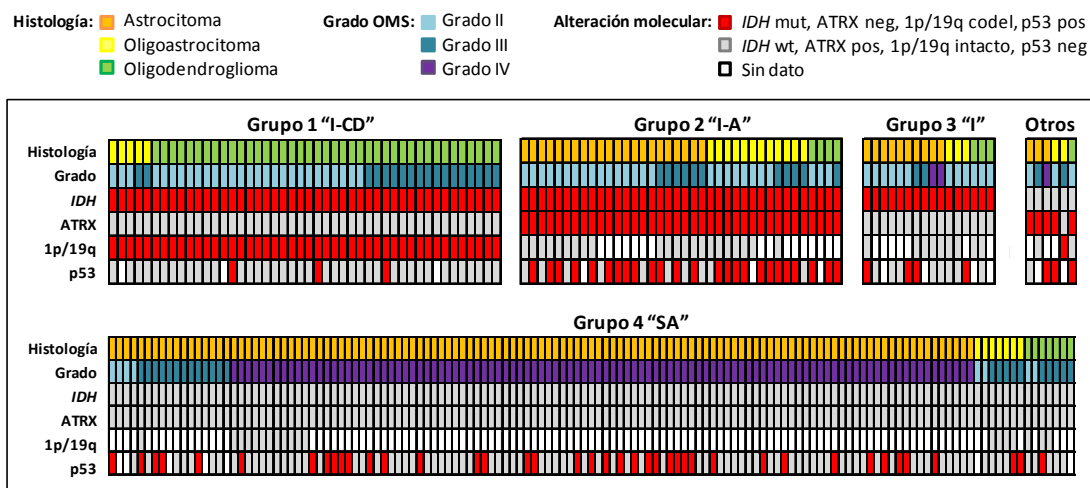


Figura 40. Representación de los diferentes grupos moleculares mostrando el diagnóstico, grado, estado mutacional de *IDH*, codeleción de 1p/19q, expresión de la proteína ATRX y p53. Encontramos seis tumores adicionales que no pertenecían a ninguno de estos grupos (Otros). Un conjunto de 31 casos sin dato del estado de *IDH* o 1p/19q, no se incluyeron en esta clasificación.

8. FACTORES CON VALOR PRONÓSTICO

8.1. Análisis del valor pronóstico de los factores clínico-patológicos

En esta serie, la **histología**, el **grado** y la **edad** fueron **factores de pronóstico** ($P < 0,0001$), mostrando una mejor supervivencia media global los OD (181,42 meses), tumores de bajo grado (178,05 meses) y los pacientes menores de 65 años (111,88 meses) en comparación a otros diagnósticos (OA, A II/III o GBM; 109,87 meses, 67,58 meses y 14,47 meses, respectivamente), a tumores de alto grado (44,56 meses) o a pacientes mayores de 65 años (13,81 meses) (Figura 41). Sin embargo, aunque se observó el valor pronóstico del subtipo histológico, las diferencias de supervivencia entre los pacientes con OA frente a OD, o frente a As de grados II/III no fueron significativas ($P = 0,109$ ó $P = 0,391$, respectivamente).

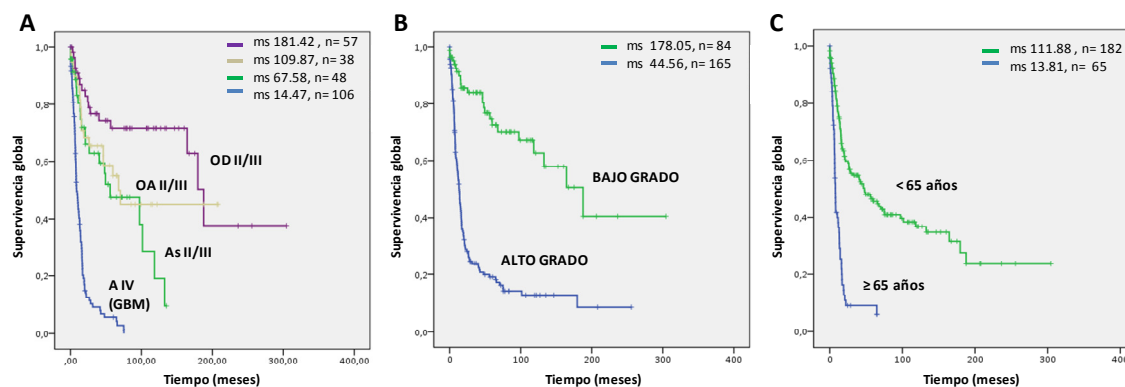


Figura 41. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de toda la serie de acuerdo al (A) subtipo histológico, (B) grado y (C) grupos de edad. ms, media de supervivencia. $P < 0,0001$.

8.2. Análisis del valor pronóstico de los marcadores moleculares analizados

En cuanto al valor pronóstico de los marcadores moleculares estudiados en esta serie, la **mutación de IDH** y la **pérdida de 1p/19q** fueron **factores de buen pronóstico**, ya fuera teniendo en cuenta toda la serie, o dentro de cada diagnóstico, grado o grupo de edad ($P < 0,01$). Los pacientes con tumores *IDH* mutado y codeleción de 1p/19q tenían una supervivencia de 187,8 meses (15,5 años) y 162,3 meses (13,5 años), respectivamente, siendo significativamente inferior la de aquellos sin alteración en *IDH* ni en 1p/19q (18,4 y 91 meses, respectivamente). Además, aunque se analizaron pocos casos para determinar el alargamiento telomérico ($n = 47$), se observó que **ALT** también tenía valor pronóstico, teniendo una mayor supervivencia aquellos casos con ALT-positivo (86,48 meses frente a 40,19) ($P < 0,0001$) (Figura 42). Por el contrario, analizando toda la serie, la expresión de p53 no se correlacionaba con SG ($P = 0,81$).

Por otro lado, teniendo en cuenta las bajas frecuencias de pérdida de expresión de ATRX en OD puros con pérdida de 1p/19q y en GBM, se estudió el **valor pronóstico** de la expresión de ATRX considerando únicamente los casos con componente astrocitario (OA y As grados de la OMS II-III) y 1p/19q intacto. En este conjunto de tumores, los pacientes con ausencia de expresión de **ATRX** tenían un mejor pronóstico (111,8 meses; 9,3 años) que aquellos que tenían expresión positiva (47,5 meses; 3,9 años) ($P < 0,0001$). Además, en estos pacientes, la expresión de **p53** también tuvo un valor pronóstico significativo ($P = 0,039$), mostrando una mayor supervivencia los casos de expresión positiva para p53 (93,5 vs 47,2 meses) (Figura 42).

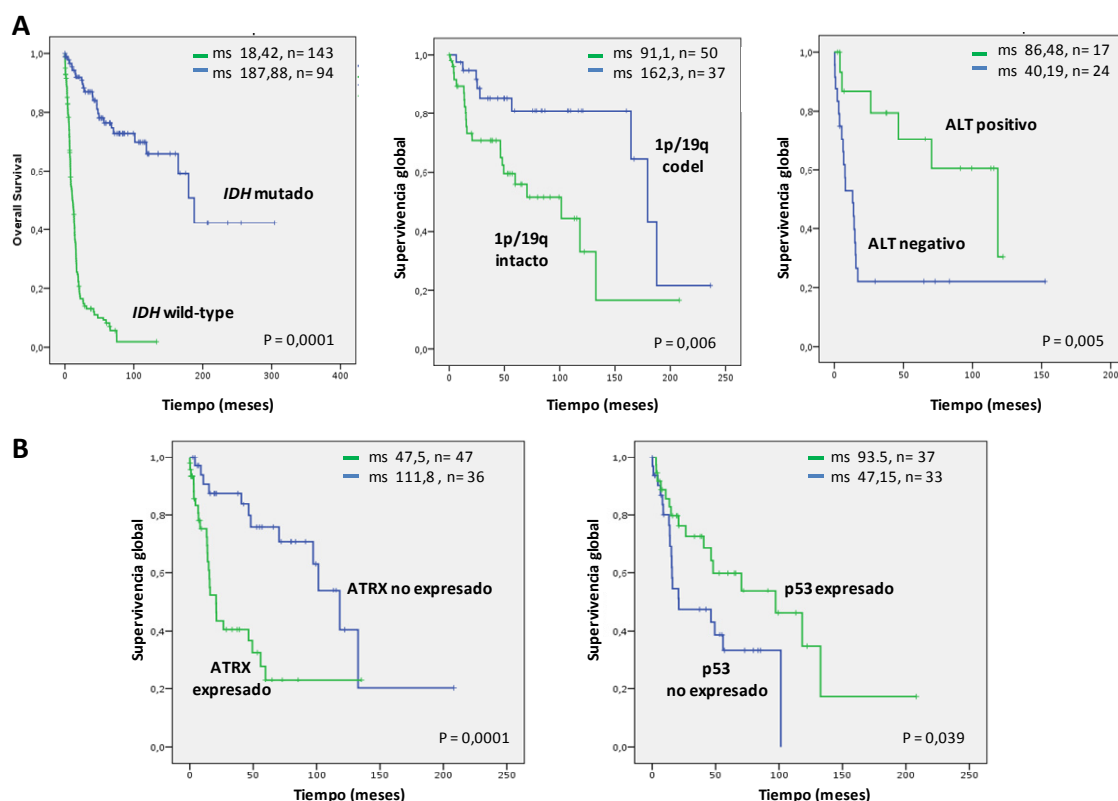


Figura 42. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier. (A) En todos los casos analizados, de acuerdo al estado mutacional de *IDH*, pérdida combinada de 1p/19q y al alargamiento telómero (ALT). **(B)** En pacientes con tumores con componente astrocitario y sin codeleción de 1p/19q, en función de la expresión protéica de ATRX y de p53. ms, media de supervivencia.

Un análisis multivariante de Cox de los factores clínicos y moleculares mostró que la mutación de *IDH* [P = 0,0001, HR = 7,712 (IC 95% = 3,28-18,11)] y el **grado tumoral** [P = 0,031, HR = 2,306 (IC 95% = 1,08-4,92)] eran las variables con un factor pronóstico independiente relevante para la SG en este modelo.

8.3. Estudio del valor pronóstico de la clasificación molecular basada en el estado de mutacional de *IDH*, codeleción de 1p/19q y la expresión de ATRX

Se analizaron la edad del diagnóstico y el comportamiento clínico en los distintos grupos moleculares establecidos. Los pacientes con tumores clasificados molecularmente como grupo 1, 2 o 3 (I-CD, I-A o I) eran más jóvenes que aquellos que tenían la firma molecular 4 (SA); 43,9, 39,2 y 40,8 frente a 60,7 años. Por otra parte, las curvas de Kaplan-Meier mostraron diferencias significativas en la supervivencia para los distintos grupos moleculares (P < 0,0001) (Figura 43 y Tabla 15).

Los pacientes con las firmas moleculares "I-CD" y "I-A" sobrevivieron más tiempo que los pacientes con "I" (solo *IDH* mutado) (179,5, 118,3 y 82,7 meses, respectivamente, $P = 0,029$). Sin embargo, no hubo una diferencia significativa en la supervivencia de los pacientes con tumores "I-CD" y "I-A" ($P = 0,22$). Por último, los pacientes cuyos tumores eran *IDH* wild-type, sin codeleción en 1p/19q y *ATRX* expresado "SA" tuvieron un pronóstico de 10,63 meses, y por lo tanto, un comportamiento clínico significativamente peor que los tres grupos moleculares mencionados anteriormente ($P < 0,0001$) (Figura 43 y en la Tabla 15).

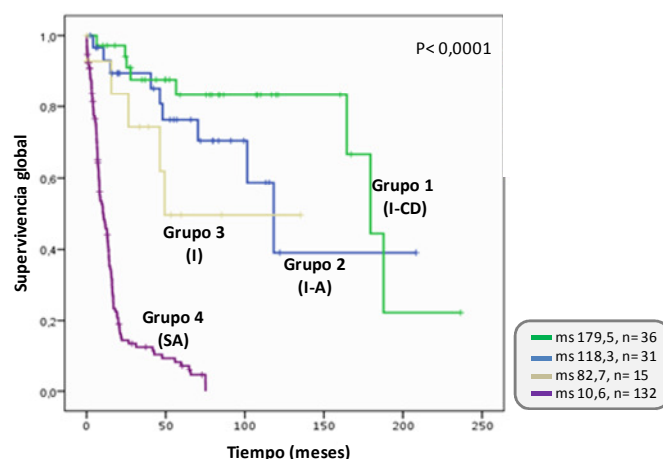


Figura 43. Las curvas de Kaplan-Meier según la clasificación molecular mostraron diferencias entre los grupos ($P < 0,0001$). **Grupo 1:** *IDH* mutado, 1p/19q codelecionado y *ATRX* expresado; **Grupo 2:** *IDH* mutado, 1p/19q intacto y ausencia de expresión de *ATRX*; **Grupo 3:** *IDH* mutado, 1p/19q intacto y *ATRX* expresado; **Grupo 4:** *IDH* wild-type, 1p/19q intacto y expresión de *ATRX*

9. PERFILES DE METILACIÓN EN TUMORES OLIGODENDROGLIALES (TO)

9.1. Comparación de los perfiles de metilación de los TO con cerebro normal

Se compararon los perfiles de metilación de 46 TO con 5 muestras de tejido no tumoral (CN) con el objetivo de identificar genes con un patrón de metilación aberrante. En el análisis comparativo de estos dos grupos (t-test) se identificaron diferencias de metilación únicamente en el 10% de los sitios CpG (45.917/473.864 sondas), encontrando que la mayoría de sondas diferentes entre los grupos estaban hipermetiladas en las muestras tumorales (41.213 CpGs, 89,8%) y únicamente el 10,2% (4.704 CpGs) se encontraban hipometiladas con respecto al cerebro normal (CN) ($q < 0,05$) (Figura 44).

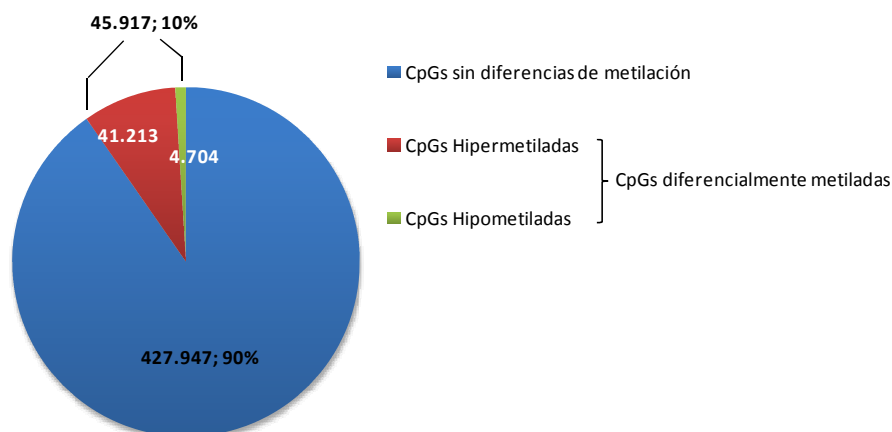


Figura 44. Porcentaje de sitios CpG que se encuentran alterados o que no varían comparando los tumores oligodendrogiales con las muestras de cerebro normal ($q < 0,05$).

Los sitios CpG hipermetilados en los tumores se encontraban mayoritariamente distribuidos en **islas** (34%; 14.120 sondas) y dentro del **cuerpo del gen** (42%; 17.322 sondas), mientras que las sondas hipometiladas se distribuían a lo largo de todo el genoma (open sea, 69%; 3.243 sondas) y gran parte situadas en **zonas intergénicas** (48%; 2.263 CpGs) (Figura 45).

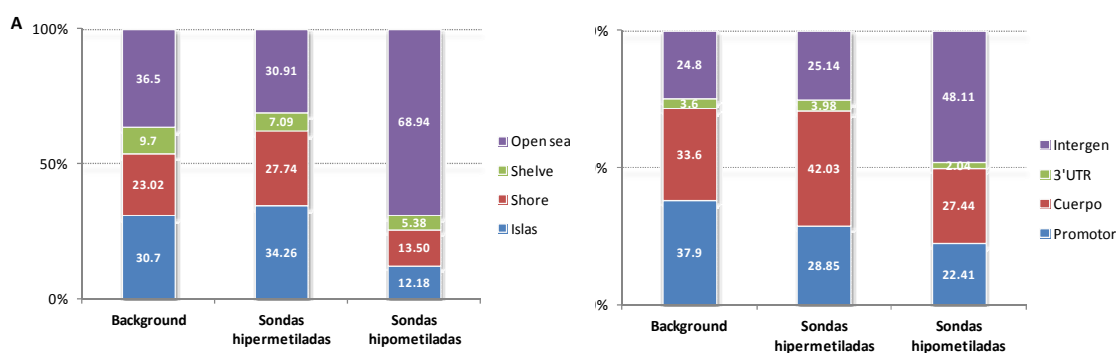


Figura 45. Localización y distribución de las 45.917 CpGs diferencialmente metiladas en muestras tumorales frente a tejido normal. **(A)** Según la concentración de los sitios CpG. **(B)** Según la distribución genómica. Se muestran las sondas diferencialmente hipermetilados, hipometiladas y la distribución establecida por el array (*background*).

En la Tabla 16 se muestran los genes más diferencialmente hipermetilados en los tumores frente a los controles ($q < 0,05$), y con más de 8 CpGs metiladas en el promotor. Entre ellos destacan genes relacionados con **neurogénesis** (*GDNF*), **remodelación de la cromatina** (*HIST1H1A*, *HDAC4*), **apoptosis celular** (*GOS2*, *KIAA0495*, *CFLAR*) o **regulación transcripcional** (*HOXC4*, *RERE*, *ERBB2*).

Tabla 16. 43 genes hipermetilados en la región promotora en tumores oligodendrogiales. En azul se muestran los genes con funciones relevantes.

GENES HIPERMETILADOS EN TUMOR			
Gen	Descripción	Localización	Metilación (CpGs)
<i>GDNF*</i>	Glial cell derived neurotrophic factor	5p13.1	24
<i>GNMT*</i>	Glycine N-methyltransferase	6p12	23
<i>CTBP2</i>	C-terminal binding protein 2	10q26.13	23
<i>MBP</i>	Myelin basic protein	18q23	22
<i>HOXC4*</i>	Homeobox C4	12q13.3	21
<i>HDAC4</i>	Histone deacetylase 4	2q37.3	17
<i>RAI1</i>	Retinoic acid induced 1	17p11.2	16
<i>IER3*</i>	Immediate early response 3	6p21.3	15
<i>TOX2*</i>	TOX high mobility group box family member 2	20q13.12	14
<i>RBM24</i>	RNA binding motif protein 24	6p22.3	13
<i>EPHX3</i>	Epoxide hydrolase 3	19p13.12	13
<i>TTC12*</i>	Tetratricopeptide repeat domain 12	11q23.2	13
<i>ESRRG</i>	Estrogen-related receptor gamma	1q41	13
<i>THRB</i>	Thyroid hormone receptor, beta	3p24.2	12
<i>TXNRD1</i>	Thioredoxin reductase 1	12q23	12
<i>EVX1*</i>	Even-skipped homeobox 1	7p15.2	12
<i>DSC3*</i>	Desmocollin 3	18q12.1	12
<i>FLOT1</i>	Flotillin 1	6p21.3	12
<i>HIST1H1A*</i>	Histone cluster 1, h1a	6p21.3	11
<i>KLHL35</i>	Kelch-like 35 (Drosophila)	11q13.4	11
<i>RERE</i>	Arginine-glutamic acid dipeptide (RE) repeats	1p36.23	11
<i>ATP5G2</i>	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit C2	12q13.13	11
<i>LINGO3</i>	Leucine rich repeat and Ig domain containing 3	19q13.3	10
<i>LRR61</i>	Leucine rich repeat containing 61	7q31	10
<i>CFLAR</i>	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	2q33	10
<i>DLEU7</i>	Deleted in lymphocytic leukemia, 7	13q14.3	10
<i>ERBB2</i>	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2	17q11.2	10
<i>RBP1*</i>	Retinol binding protein 1, cellular	3q23	10
<i>KLHL1</i>	Kelch-like 1 (Drosophila)	13q21	10
<i>NUAK1</i>	NUAK family, SNF1-like kinase, 1	12q23.3	9
<i>CMYA5</i>	Cardiomyopathy associated 5	5q14.1	9
<i>KCNB1</i>	Potassium voltage-gated channel, Shab-related subfamily, member 1	20q13.2	9
<i>G0S2*</i>	G0/g1switch 2	1q32.2	9
<i>EFCAB4B</i>	EF-hand calcium binding domain 4B	12p13.32	9
<i>KIAA0495</i>	Kiaa0495	1p36.32	9
<i>BHMT</i>	Betaine--homocysteine S-methyltransferase	5q13.1	9
<i>KY</i>	Kyphoscoliosis peptidase	3q22.1	9
<i>ADRA1A*</i>	Adrenergic, alpha-1A-, receptor	8p21.2	9
<i>C1orf94</i>	Chromosome 1 open reading frame 94	1p34.3	9
<i>HLCS</i>	Holocarboxylase synthetase	21q22.1	9
<i>VRK2</i>	Vaccinia related kinase 2	2p16.1	9
<i>ZAR1</i>	Zygote arrest 1	4p11	9
<i>LC34A2</i>	Solute carrier family 34, member 2	4p15.2	9

*Genes previamente descritos como hipermetilados en gliomas (84, 99)

Posteriormente, se determinaron las diferencias entre las muestras de tumores mediante un análisis de componentes principales (PCA) y un clúster jerárquico **no supervisado** usando las sondas más variables ($\sigma= 0,7$; 2.816 CpGs). Estos análisis revelaron dos grupos claramente definidos con diferentes perfiles de metilación, uno de ellos con la mayor parte de las sondas hipermetiladas (**G-CIMP+**), y el otro con un patrón no hipermetilado (**G-CIMP-**). El perfil G-CIMP+ estaba asociado a la **mutación de IDH** mientras el otro., G-CIMP-, correspondía a tumores sin mutación (**IDHwt**) (Figura 46).

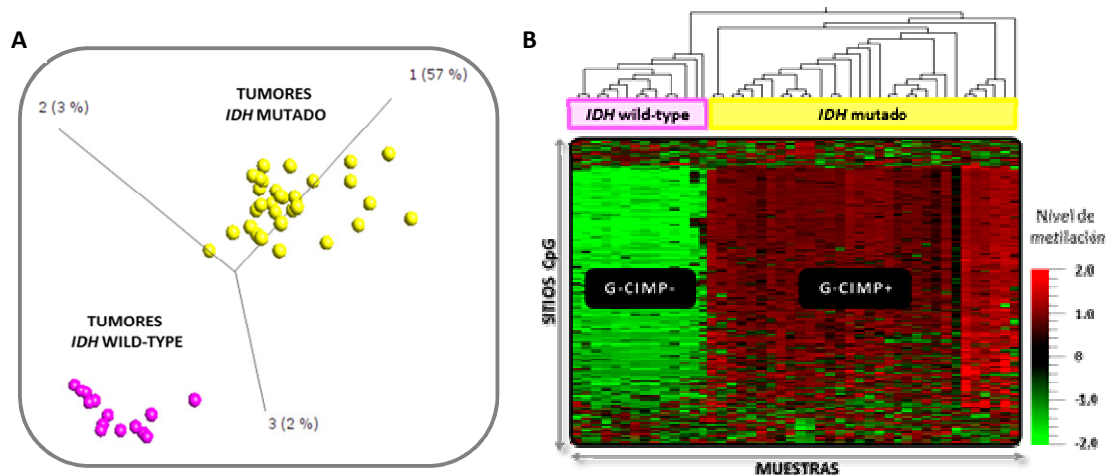


Figura 46. Análisis de **(A)** componentes principales y **(B)** clúster no supervisado de las 2.816 CpG más variables ($\sigma= 0,7$). Ambos gráficos muestran dos grupos de tumores con **perfiles de metilación distintos que pueden relacionarse con el estado mutacional del gen IDH**. En el clúster se representan las sondas en el eje horizontal y las muestras en el eje vertical. En rosa se indican los tumores con *IDH* wild-type y en amarillo los que tenían la mutación, observándose los altos niveles de metilación (rojo) en este último grupo.

9.2. Perfiles de metilación asociados al estado mutacional del gen IDH

Para caracterizar los **patrones de metilación asociados al estado mutacional de IDH** se realizaron análisis supervisados. Mediante la comparación de los perfiles de metilación entre tumores con mutación de *IDH* (32) o wt (14) se encontraron un total de **185.160 sitios CpG** (correspondientes a 16.978 genes) diferencialmente metilados entre los dos grupos de tumores ($q < 0,05$), destacando que la mayoría estaban hipermetilados en los tumores con mutación de *IDH* (89,9%). Las diferencias en los niveles de metilación entre los dos grupos se reflejan en la Figuras 47.

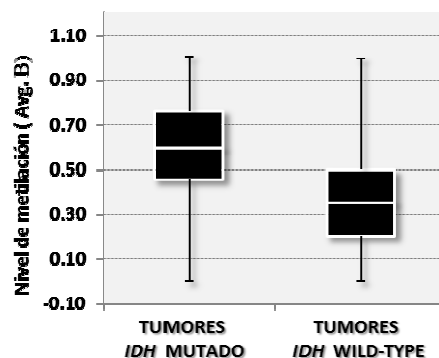


Figura 47. Diagrama de caja indicando el valor medio y el percentil 75 y 25 de los niveles de metilación de los grupos de tumores en función de la mutación de *IDH*. Los extremos verticales muestran los niveles máximo y mínimo de metilación de los dos grupos.

Se identificó metilación en la región promotora de algunos genes como *GDNF*, *PRDX1*, *RBP1*, *KIAA0495* y genes de la familia *HOX* (*SHOX2*, *HOXC* y *HOXD*), en los tumores con *IDH* mutado, que no estaba presente en los tumores no mutados. Aunque la mayoría de los genes diferencialmente metilados se encontraban metilados en los tumores con *IDH* mutado, también se detectaron algunos genes (*SMOC1* y *DLL3*) que presentaban niveles más bajos de metilación en el cuerpo de los genes al compararlos con los tumores no mutados (Figura 48).

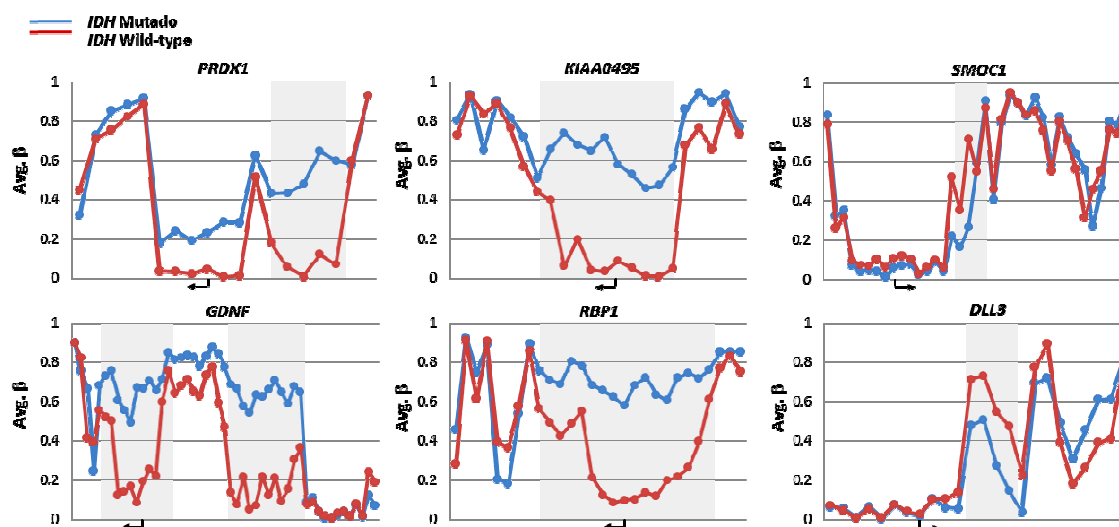


Figura 48. Representación gráfica de los genes seleccionados asociados con el perfil hipermetilador de los tumores *IDH* mutados. Se muestran los niveles de metilación Avg. β para cada sitio CpG (círculos dentro de las líneas) y el sitio de inicio de la transcripción mediante una flecha negra. Las áreas sombreadas en gris representan las regiones con más diferencias de metilación entre los grupos. Los tumores *IDH* wild-type se representan en rojo y los *IDH* mutado en azul.

9.3. Perfiles de metilación asociados a la pérdida de 1p/19q

Mediante análisis supervisados se comparó el perfil de metilación de los tumores con pérdida combinada de 1p/19q (22 casos) frente al de los tumores que no la presentaban (24 casos), y se obtuvieron **77.095 sitios CpG** (11.948 genes) significativamente diferentes entre los grupos ($q < 0,05$). Más del 90% de estas sondas presentaban niveles de metilación superiores en tumores con codeleción de 1p/19q (70.854 CpGs correspondientes a 10.767 genes) y se distribuían por todos los cromosomas de manera similar. En cambio, se observó una acumulación de **sitios CpG no metilados en el brazo cromosómico 19q** (Figura 49), concretamente en regiones promotoras de genes *ZNF* (zinc finger) localizados en 19q13 (*ZNF577*, *ZNF578*, *ZSCAN1* y *ZNF135*, entre otros).

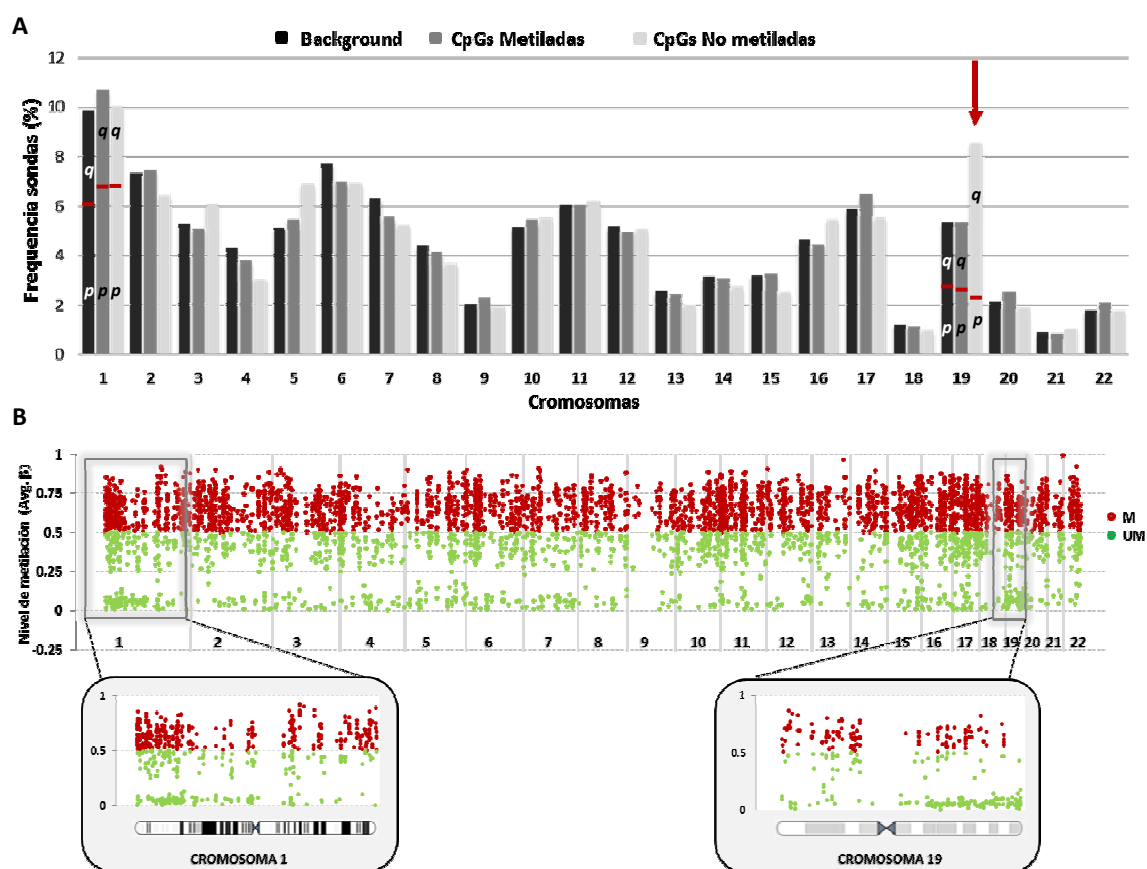


Figura 49. (A) Distribución cromosómica de las sondas diferencialmente metiladas comparando tumores con pérdida combinada de 1p/19q frente a tumores sin pérdida ($q < 0,05$). En el primer gráfico, se calcularon el número de CpGs metiladas y no metiladas para cada cromosoma vs. total de sondas metiladas y no metiladas, respectivamente. La flecha roja muestra la elevada frecuencia de sondas no metiladas localizadas en el cromosoma 19 (concretamente en 19q) en los tumores con la codeleción de 1p/19q en comparación con el *background*. **(B)** Gráfica que muestra los niveles de metilación (Avg. B) de las sondas más significativamente diferentes ($q < 0,05$) y variables ($\sigma=0,3$) entre los dos grupos de tumores (con pérdida y sin pérdida de 1p/19q) situadas en islas/shores de la región promotora de los genes. Se representan los niveles de metilación (Avg. B) en función de su localización genómica (metilado; rojo, no metilado; verde). En la parte inferior se indican los cromosomas. Además, de manera específica se muestra la distribución y nivel de metilación de los sitios CpG localizados en los cromosomas 1 y 19.

También se encontraron otros genes no metilados situados en la misma citobanda (19q), descritos en la siguiente tabla:

Tabla 17. Genes localizados en 19q no metilados en casos con codelección y metilados en tumores 1p/19q intactos

Gen	Descripción	Gen	Descripción
<i>GPATCH1</i>	G patch domain containing 1	<i>FBXO46</i>	F-box protein 46
<i>PSENFEN</i>	Presenilin enhancer 2 homolog	<i>MYPOP</i>	Myb-related transcription factor, partner of profilin
<i>HSPB6</i>	Heat shock protein, alpha-crystallin-related, B6	<i>CCDC9</i>	Coiled-coil domain containing 9
<i>PSMD8</i>	Proteasome 26S subunit, non-ATPase, 8	<i>GYS1</i>	Glycogen synthase 1
<i>HNRNPL</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	<i>RPS11</i>	Ribosomal protein S11
<i>MRPS12</i>	Mitochondrial ribosomal protein S12	<i>CTU1</i>	ATP binding domain 3
<i>C19orf54</i>	Chromosome 19 open reading frame 54	<i>CCDC106</i>	Coiled-coil domain containing 106

Cuando se realizaron los análisis de PCA y la agrupación jerárquica de las sondas más diferencialmente metiladas, y que además explicaban el 80% de la variación entre los tumores con o sin pérdida de 1p/19q ($q < 8,8e-5$; 725 CpGs), pudimos distinguir **tres subgrupos de TO** con perfiles de metilación distintos (Figura 50).

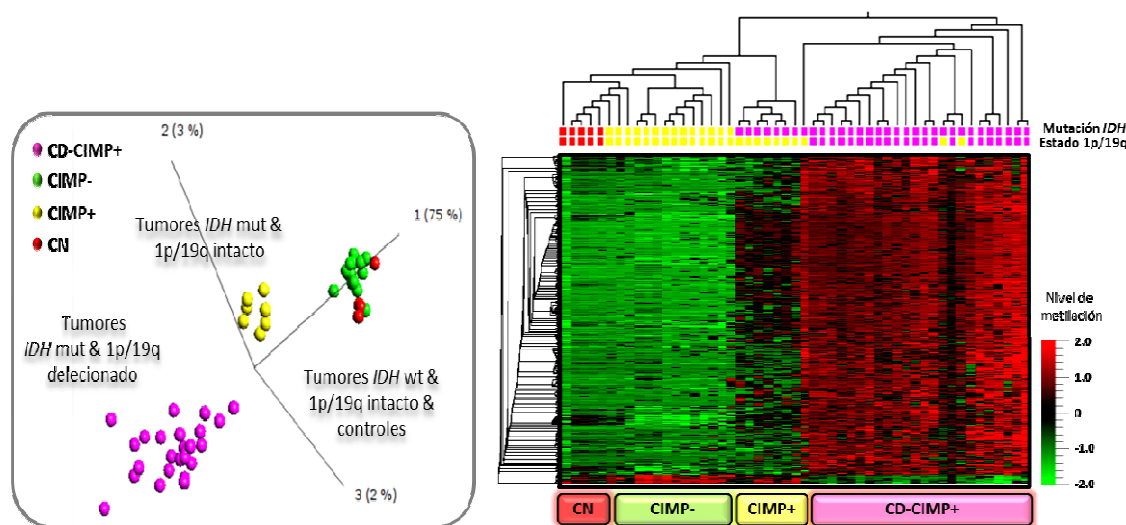


Figura 50. Perfiles de metilación asociados a la pérdida combinada de 1p y 19q. Tanto el PCA como el clúster supervisado usando las 725 sondas CpGs más variables entre tumores con y sin codelección en 1p/19q, permitieron identificar tres grupos de tumores con distintos perfiles de metilación. Se representa el estado mutacional del gen *IDH* (rosa, *IDH* wild-type; amarillo, *IDH* mutado) así como el estado de pérdida en 1p/19q (rosa, 1p/19q deletado; amarillo, 1p/19q intacto). Se muestran los niveles de metilación en función del código de color que se indica en la figura, siendo verde para los niveles inferiores de metilación y rojo para los niveles de mayor metilación.

9.4. Relación entre los perfiles de metilación y los parámetros moleculares y clínicos

Los grupos de tumores identificados según su patrón de metilación mostraron además características clínicas y moleculares específicas. (Figura 51, Tabla 18). Se identificó un fenotipo hipermetilador en 25 casos, donde la mayoría exhibió tanto la mutación de *IDH* como la pérdida de 1p/19q (22 casos), al que se denominó **CD-CIMP+** debido a la codeleción en 1p/19q que se asoció con un pronóstico favorable y se identificó principalmente en oligodendrogliomas puros (88% de los casos). Otro patrón hipermetilador presente en 7 tumores con *IDH* mutado y sin pérdida combinada de 1p/19q (tumores **CIMP+**) en su mayoría oligoastrocitomas (71,4%) y con un pronóstico intermedio entre tumores CD-CIMP+ y CIMP-. Por último, se detectó un perfil sin metilación global similar al tejido no tumoral (**CIMP-**, verde en la figura 8) en 14 tumores de ambas histologías, sin las alteraciones moleculares anteriormente mencionadas (mutación de *IDH* y pérdida de 1p/19q) y con un mal pronóstico. Cabe destacar, que los pacientes con tumores que presentaban alguno de los perfiles hipermetiladores (CD-CIMP+ o CIMP+) fueron más jóvenes (45 y 43 años de media) que los que presentaban un perfil no metilado (58 años). Además, la frecuencia de la mutación *TP53* también varió entre los grupos CIMP, siendo más frecuente en tumores CIMP+ (57,1%) que en los CIMP- (14%) o en los CD-CIMP+ (4%). Del mismo modo, se detectó la pérdida de expresión de ATRX en los 7 casos con perfiles CIMP+, mientras los tumores con un perfil CIMP- o CD-CIMP+ mostraron mayoritariamente expresión positiva de la proteína ATRX (71,4% y 100%, respectivamente) (Tabla 18).

Las características moleculares específicas de los tres grupos de metilación sugirieron que existía una relación entre el perfil de metilación y los parámetros moleculares y clínicos de estos tumores. Los análisis de correlación determinados mediante el coeficiente de Spearman mostraron que el **estado CIMP** estaba fuertemente asociado con la **mutación de *IDH*** ($\rho = 0,499$; $P < 0,0001$), la **pérdida combinada de 1p/19q** ($\rho = 0,842$; $P < 0,0001$), la **mutación de *TP53*** ($\rho = 0,622$; $P < 0,0001$) y el **subtipo histológico** ($\rho = 0,449$; $P < 0,001$). Por el contrario, el estado CIMP no se correlacionaba significativamente con el sexo de los pacientes ($\rho = 0,149$; $P = 0,323$), el grado histológico ($\rho = -0,126$; $P = 0,202$) o con la edad al momento del diagnóstico ($\rho = 0,09$; $P = 0,312$); a pesar de que los pacientes con perfiles CIMP+ y CD-CIMP+ eran más jóvenes que aquellos con perfil CIMP-, probablemente debido a que tenían la mutación de *IDH*.

Tabla 18. Resumen de las características moleculares y clínicas asociadas a cada perfil de metilación

ESTADO CIMP			CD-CIMP + 25 (54,3%)	CIMP + 7 (15,12%)	CIMP - 14 (30,4%)	Total 46
Datos clínicos	Diagnóstico	OD	22 (88)	2 (28,6)	9 (64,3)	33
		OA	3 (12)	5 (71,4)	5 (35,7)	13
	Grado	II	12 (48)	5 (71,4)	7 (50)	24
		III	13 (52)	2 (28,6)	7 (50)	22
	Media de edad (años)		45,2	43,3	58,2	-
	Media de SG (años) ± DS		9.99 ± 2.29	4.4 ± 1.36	1.27 ± 0.38	-
Datos moleculares	Estado IDH	Wt	0 (0)	0 (0)	14 (100)	14
		Mut	25 (100)	7 (100)	0 (0)	32
	Codelección 1p/19q	Pos	22 (88)	0 (0)	0 (0)	22
		Neg	3 (12)	7 (100)	14 (100)	24
	Alteración en TP53	Mut	1 (4)	4 (57,1)	2 (14)	7
		Wt	24 (96)	3 (42,9)	12 (86)	35
	Expresión de ATRX*	Pos	14 (100)	0 (0)	5 (71,4)	19
		Neg	0 (0)	7 (100)	2 (28,6)	9

*No se pudo analizar la expresión de la proteína ATRX para todos los casos

El análisis de la supervivencia de los pacientes con TOs en relación al estado CIMP se analizó mediante pruebas de Log-rank y curvas de Kaplan-Meier, mostrando diferencias significativas en la supervivencia para los tres grupos CIMP ($P = 0,0007$). La supervivencia media global (SG) fue mayor en pacientes con perfiles CD-CIMP+ y CIMP+ que en los que tenían tumores CIMP-, siendo de **9,99, 4,4 y 1,27 años**, respectivamente (Figura 51, Tabla 18). Sin embargo, la diferencia en la media de la SG entre los grupos CD-CIMP+ y CIMP+ no fue significativa ($P = 0,133$).

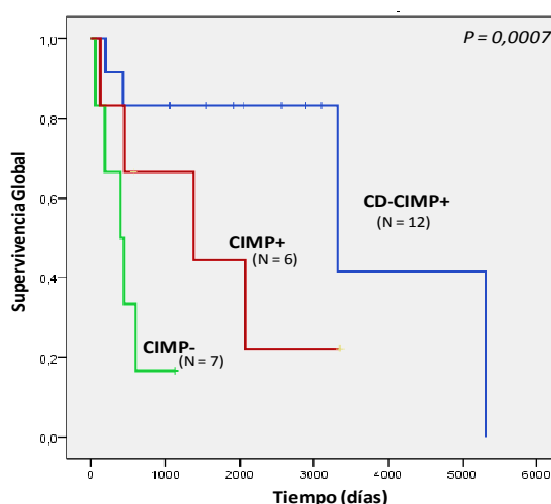


Figura 51. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier basadas en los perfiles de metilación. Los tumores CD-CIMP+ se asociaron con una supervivencia significativamente mejor.

Además del estado **CIMP**, otros factores, como el estado de la **mutación de IDH** ($P = 0,004$), la **pérdida combinada de 1p/19q** ($P = 0,013$) y el **grado** tumoral establecido por la OMS ($P = 0,033$), también tuvieron valor pronóstico. En cambio, el diagnóstico histopatológico no se correlacionó significativamente con la SG en esta serie ($P = 0,057$). Por otra parte, un análisis multivariante de Cox que incluyó las distintas variables clínicas y moleculares significativas en el análisis anterior, mostró que variables como la **mutación de IDH** ($P = 0,012$, HR= 0,17 (95% IC= 0,043-0,674)) y el **grado histológico** ($P = 0,048$, HR= 0,28 (95% IC= 0,081-0,989)) eran los factores con valor pronóstico independiente más relevantes en este modelo.

9.5. Validación mediante bases de datos externas

Para validar los resultados obtenidos, se analizaron los datos de metilación de 126 GBM descargados de la base de datos The Cancer Genome Atlas (TCGA) y 77 gliomas descritos por Turcan y colaboradores (2012) (30), incluyendo 31 OD, 6 OA, 31 AD y 9 casos de GBM.

El análisis de PCA y la agrupación jerárquica no supervisada utilizando los **4.397 sitios CpG**; identificados como diferencialmente metilados entre los grupos de tumores **CD-CIMP+** y **CIMP+**, en el conjunto de datos de TCGA revelaron que el grupo definido como G-CIMP+ por Verhaak y colaboradores (49) en muestras de GBM secundario ($n=7$) mostraba un perfil de metilación similar al estado CIMP+ identificado en nuestra serie, así como las muestras G-CIMP- ($n=119$) se asociaban con el perfil CIMP- de nuestra serie (Figura 52).

De manera similar a lo que se encontró en la serie TCGA, el análisis de la otra serie de gliomas (Turcan et al. 2012) mostró tres subgrupos de tumores con diferentes perfiles de metilación, coincidiendo con los previamente identificados en nuestra serie de TOs ($q < 0,05$; $\sigma = 0,3$) (Figura 52). Se pudo clasificar un grupo de tumores G-CIMP+ previamente descritos por Turcan et al. 2012 (30) como tumores CIMP+ ($n=21$) o CD-CIMP+ ($n=28$). La mayoría de estos tumores clasificados ahora como CIMP+ mostraron un componente astrocitario (19 de 21), mientras que los CD-CIMP+ fueron mayoritariamente diagnosticados como OD (27 de 28) (Tabla 19).

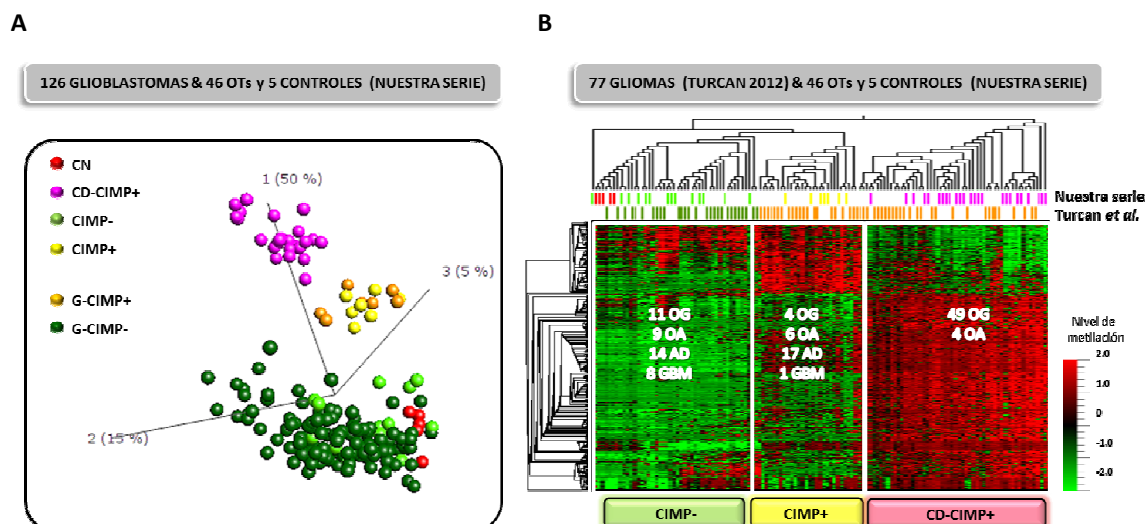


Figura 52. Validación de los grupos de metilación en dos series independientes a través del análisis de las 4.397 sondas significativas que distinguían tumores CD-CIMP+ de CIMP+. **(A)** PCA de 126 glioblastomas (GBM) de la base de datos TCGA (G-CIMP +, naranja; G-CIMP-, color verde oscuro), junto con los 46 TOs y 5 CN examinados en este estudio (CD-CIMP+, rosa; CIMP+, amarillo; CIMP-, verde; CN, rojo). La firma de metilación clasificó las muestras de GBM como CIMP+ (7 muestras) o CIMP- (119 muestras). **(B)** Agrupación jerárquica de 77 gliomas (Turcan et al.) mostrando las 1.619 sondas más variables ($\sigma = 0,3$) de las 4.397 CpGs que distinguían tumores CD-CIMP+ (28) de CIMP+ (21) (G-CIMP+, naranja; G-CIMP-, de color verde oscuro), además de los 51 muestras de nuestro estudio (CD-CIMP+, rosa; CIMP+, amarillo; CIMP-, verde; CN, rojo).

Tabla 19. Clasificación en función del estado CIMP de los casos de la serie de validación (TCGA y Turcan et al.) junto con los 46 tumores oligodendrogiales de nuestra serie. En azul se indica el % del subtipo histológico mayoritario encontrado en cada perfil CIMP

SUBTIPO	CIMP- (N=161)			TOTAL	CIMP+ (N=35)			TOTAL	CD-CIMP+ (N=53)			TOTAL
	Turcan et al.	TCGA	Nuestra serie		%	Turcan et al.	TCGA		Nuestra serie	%	Turcan et al.	
OD	2	-	9	6,8	2	-	2	11,4	27	-	22	92,5
OA	4	-	5	5,6	1	-	5	17,1	1	-	3	7,5
AD	14	-	-	8,7	17	-	-	48,6	-	-	-	0
GBM	8	119	-	78,9	1	7	-	22,8	-	0	-	0

Por lo tanto, los **nuevos subgrupos de metilación** descritos en nuestra serie se pudieron identificar en otras bases de datos externas, validando así nuestros resultados.

9.6. Caracterización de los patrones de metilación identificados en TOs

Las diferencias entre los **tres perfiles de metilación** se estudiaron mediante la comparación de los perfiles de metilación de cada grupo de tumores **frente a los controles de CN** ($q < 0,05$) (Figura 53). En la comparación entre el grupo CD-CIMP+ y los CN se detectó un 24,7% de sitios CpG diferencialmente metilados (**117.005 CpG**), mientras los tumores CIMP+ tenían **101.254 sondas** con metilación diferente a los controles (21,4%). En cambio, se encontró un perfil de metilación altamente similar entre los tumores CIMP- y las muestras de cerebro normal (**392 CpGs**).

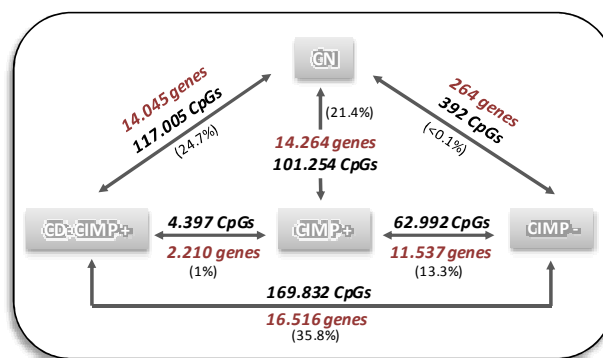


Figura 53. Representación de los sitios CpG (y genes correspondientes) **diferencialmente metilados** en los grupos de tumores CIMP identificados y los controles de cerebro normal.

Posteriormente, se compararon entre sí los tres grupos de tumores con distintos fenotipos de metilación para **identificar el número de sondas y genes con metilación diferente** entre ellos. Cuando se analizó el grupo CIMP- frente a los tumores CIMP+ y los CD-CIMP+ se detectaron más sondas diferencialmente metiladas entre los CD-CIMP+ y los tumores CIMP- (35,8% de las sondas totales) que entre los grupos CIMP+ y CIMP- (13,3%) (Figura 53). En ambos casos, la mayor parte de las CpG se encontraron significativamente metiladas respecto a los tumores CIMP- y aunque había un mayor número de sondas metiladas en CD-CIMP+ que en CIMP+ (152.273 y 58.694 CpGs, respectivamente), el número de genes metilados fue similar (15.366 y 10.721). Esto indicaba que las diferencias entre los grupos CD-CIMP+ y CIMP+ se debían a la intensidad de la metilación de los genes, ya que en los tumores CD-CIMP+ había el doble de sondas metiladas por gen (**10 CpGs metiladas/gen**) que en los CIMP+ (**5 CpGs metiladas por gen**) (Figura 54).

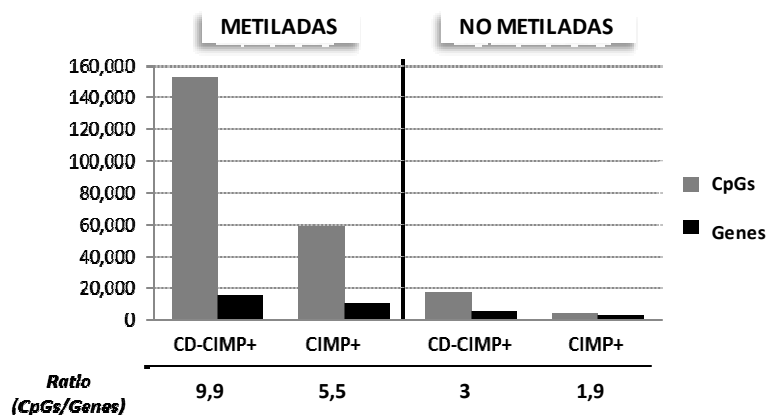


Figura 54. Gráfico representando las CpGs y genes diferencialmente metilados (GDM) entre los grupos de tumores CD-CIMP+ y CIMP+ en comparación con los tumores CIMP-. Se calculó el ratio de sondas CpG por gen para cada grupo.

9.7. Localización y distribución de la metilación diferencial entre cada grupo CIMP y el CN

A pesar de las pocas diferencias entre los tumores CIMP- y los CN, cuando se estudió la localización de las sondas diferencialmente metiladas se observó que en los tumores CIMP-, la hipermetilación se producía en las CpGs situadas en el cuerpo de los genes (60,3%) y era relativamente poco frecuente en las zonas promotoras (17,4%) comparado con el *background* (37,9%). En cambio, la pérdida de metilación o hipometilación afectaba a los promotores de los genes (43,4%). En el caso de los tumores CD-CIMP+ y CIMP+ frente a CN, la distribución de las CpGs diferencialmente metiladas (hiper o hipometiladas) era similar a las sondas incluidas en el array de metilación (*background*) (Figura 55).

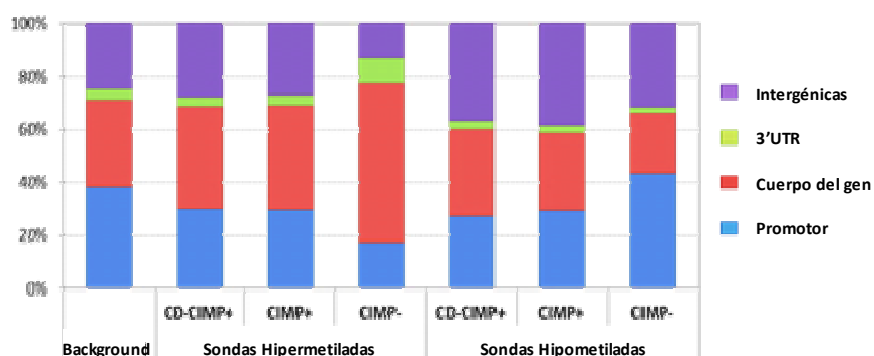


Figura 55. Distribución de la metilación diferencial en cada grupo CIMP en comparación con los controles ($q < 0,05$) y en el *background* en relación a su localización genómica (regiones intergénicas, 3'UTR, cuerpo o región promotora).

En cuanto a la densidad de las CpGs, las sondas en las que se detectó pérdida de metilación en todos los grupos CIMP con respecto al tejido normal (hipometilación) se distribuían por todo el genoma (*open sea*), en lugar de estar concentradas en islas, *shores* o *shelves* (Figura 56).

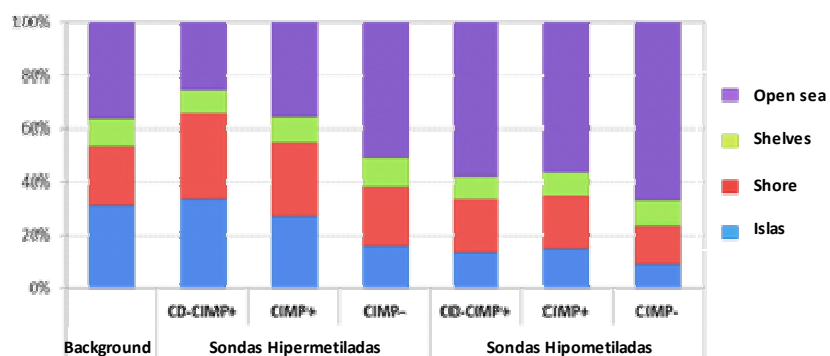


Figura 56. Distribución de la metilación en cada grupo CIMP en comparación con los controles ($q < 0,05$) y en el *background* en relación con su localización en los sitios CpG (islas, *shore*, *shelves* y *open sea*).

La localización cromosómica de las CpGs diferencialmente metiladas en los tumores CIMP+ y CD-CIMP+ respecto al CN fue similar a lo largo de todas las cromosomas. Por el contrario, el grupo de tumores con perfil CIMP- mostró una acumulación significativa de sondas con metilación aberrante en el cromosoma 7, y la pérdida de metilación en los cromosomas 1, 11, 12 y 19 (Figura 57).

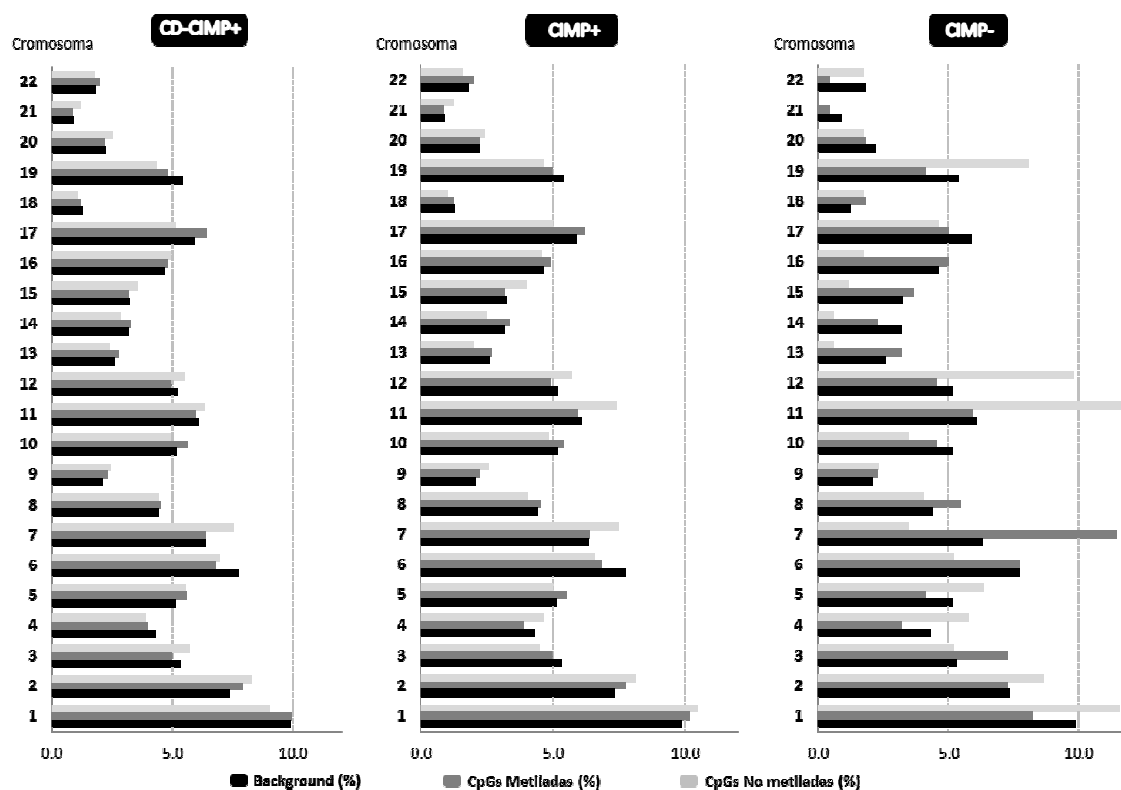


Figura 57. Distribución cromosómica de las sondas diferencialmente metiladas y de las sondas contenidas en el array de metilación (*background*) entre cada uno de los grupos de tumores CIMP (CD-CIMP+, CIMP+ y CIMP-) con respecto a los controles de cerebro normal.

9.8. Identificación de los genes diferencialmente metilados entre tumores CD-CIMP+ y CIMP+

Dado que los tumores CIMP+ mostraron ciertas diferencias en el patrón de metilación frente a los CD-CIMP+ (a pesar de que ambos grupos presentaban la mutación de *IDH*), y que estas diferencias podrían atribuirse a la pérdida de 1p/19q, quisimos identificar los genes diferencialmente metilados (GDM) entre los dos grupos. Se encontraron un total de **4.397 sondas (2.210 genes)** significativamente diferentes entre **CD-CIMP+** y **CIMP+** ($q < 0,05$) (Figura 53), de las cuales 2.508 estaban metiladas y 1.889 no metiladas en el primer grupo de tumores (CD-CIMP+).

A continuación, se muestra una lista de 30 genes con metilación diferente entre los tumores CD-CIMP+ y CIMP+ ($q < 0,05$) (Tabla 20).

Tabla 20. 30 GDM entre CD-CIMP+ y CIMP+ con más de 3 CpGs localizadas en el promotor dentro de islas y shores (q < 0,05). En azul se indican los genes en los que se había detectado metilación aberrante en otros tipos de tumores.

METILADOS EN CD-CIMP+ & NO METILADOS EN CIMP+			
Gen	Descripción	Localización	Metilación (CpGs)
<i>LDHA</i>	Lactate dehydrogenase A	11p15.1	8
<i>CTSZ</i>	Cathepsin Z	20q13.32	8
<i>HORMAD2</i>	HORMA domain containing 2	22q12.2	7
<i>PLOD2</i>	Procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	3q24	6
<i>FSCN1</i>	Fascin homolog 1, actin-bundling protein	7p22.1	6
<i>PTRF</i>	Polymerase I and transcript release factor	17q21.31	6
<i>ARSG</i>	Arylsulfatase G	17q24.2	6
<i>CDX1</i>	Caudal type homeobox transcription factor 1	5q32	4
<i>FGFR2</i>	Fibroblast growth factor receptor 2	10q26.13	4
<i>HTRA1</i>	HtrA serine peptidase 1	10q26.13	4
<i>SFT2D3</i>	SFT2 domain containing 3	2q14.3	4
<i>BVES</i>	Blood vessel epicardial substance	6q21	4
<i>EYA4</i>	Eyes absent homolog 4	6q23.2	4
<i>PHACTR2</i>	Phosphatase and actin regulator 2	6q24.2	4
<i>GAS2L3</i>	Growth arrest-specific 2 like 3	12q23.1	4
<i>JAG1</i>	Jagged 1	20p12.2	4

NO METILADOS EN CD-CIMP+ & METILADOS EN CIMP+			
Gen	Descripción	Localización	Metilación (CpGs)
<i>PPT2</i>	Palmitoyl-protein thioesterase 2	6p21.32	10
<i>NEK9</i>	NIMA (never in mitosis gene a)- related kinase 9	14q24.3	8
<i>DDN</i>	Dendrin	12q13.12	7
<i>THEM4</i>	Thioesterase superfamily member 4	1q21.3	5
<i>MAGI2</i>	Membrane associated guanylate kinase inverted 2	7q21.11	5
<i>RHOF</i>	Ras homolog gene family, member F	12q24.31	5
<i>COASY</i>	Coenzyme A synthase	17q21.31	5
<i>LOC400931</i>	LOC400931	22q13.31	4
<i>PLD2</i>	Phospholipase D2	17p13.2	4
<i>TRIP4</i>	Thyroid hormone receptor interactor 4	15q22.31	4
<i>SNORA38</i>	Small nuclear RNA, H/ACA box 38	6p21.33	4
<i>FGGY</i>	FGGY Carbohydrate Kinase domain-containing protein	1p32.1	4
<i>FBXO22</i>	F-box protein 22	15q24.2	4
<i>GRPEL2</i>	GrpE-like 2, mitochondrial	5q33.1	4

El análisis funcional de los **2.210 GDM** entre CD-CIMP+ y CIMP+ mediante el programa DAVID reveló que estaban relacionados con la **regulación positiva de la transcripción** ($P = 4,59E-10$) y la **diferenciación neuronal** ($P = 3E-6$), entre otras funciones (Tabla 21).

Tabla 21. Funciones más relevantes de los 2,210 genes diferencialmente metilados entre los grupos de tumores con perfil metilador CD-CIMP+ y CIMP+. P-valor calculado por el test de Fisher para el análisis de enriquecimiento de genes.

Función	Genes	P-Valor
Regulación positiva de la transcripción	116	4,59E-10
Regulación positiva de la expresión génica	117	1,43E-09
Regulador de la actividad GTPasa	86	3,25E-08
Proyección de la célula	126	3,92E-08
Proteínas con actividad quinasa	112	6,32E-07
Axonogénesis	46	2,70E-06
Diferenciación neuronal	84	3,00E-06
Morfogénesis neuronal	49	3,52E-06
Fosforilación	134	6,63E-06
Relacionados con cáncer	70	8,73E-06
Desarrollo neuronal	67	1,25E-05
Adhesión celular	115	7,72E-05

Por otro lado, no se encontraron diferencias en la distribución de las CpG diferencialmente metiladas entre los grupos CD-CIMP+ y CIMP+. Además, para ver la similitud entre estos dos perfiles (CD-CIMP+ y CIMP+) se compararon los genes diferencialmente metilados en cada grupo respecto al CN (14.045 y 14.264, respectivamente) y frente al perfil CIMP- (16.516 en CD-CIMP+ y 11.537 genes en CIMP+). De este modo, se detectó que compartían entre el 60,5 y 70% de los genes diferencialmente metilados.

9.9. Validación de los perfiles de metilación y de genes candidatos

9.9.1. Validación de la metilación en genes candidatos

Se seleccionaron los siguientes genes para validar el estado de metilación mediante secuenciación directa del ADN tratado con bisulfito sódico: *KIAA0495*, *HIST1H1A*, *GDNF*, *DLEU7* (Figura 58 y 59). Para ello se utilizaron 4 muestras con *IDH* mutado, 4 muestras con *IDH* wt y 2 cerebros normales.

El gen *HIST1H1A* se seleccionó por su implicación en la remodelación de la cromatina y su posible efecto en la transcripción. El gen *DLEU7* por su localización cromosómica (locus supresor tumoral 13q14)

y por presentar hipermetilación en otras neoplasias como la leucemia (100). El gen *GDNF* por su relación con diferenciación neuronal y neurogénesis (99), y *KIAA0495* por encontrarse frecuentemente reprimido en tumores oligodendrogiales (101), siendo la metilación el posible causante de su inactivación transcripcional.

En la región promotora del gen *GDNF* la secuenciación mostró una metilación bialélica en todas las CpGs analizadas de los 4 tumores *IDH* mutados, mientras en las muestras *IDH* wt la metilación se encontraba únicamente en un alelo, y los CN no presentaban metilación en ninguna de las CpGs. Sin embargo, la secuenciación del promotor de *KIAA0495* detectó la presencia de un alelo metilado, así como la del alelo no metilado, en las CpGs estudiadas de los tumores *IDH* mutados; esta metilación no se observó en las CpGs analizadas en tumores *IDH* wt ni en CN (Figura 58). El estudio de la metilación por secuenciación en los genes *DLEU7* y *HIST1H1A*, identificó la presencia de un alelo metilado y del otro no metilado en las muestras tumorales analizadas, ya fueran *IDH* mutado o wt, mientras en las muestras de CN solo se observó el alelo no metilado. Por lo tanto, la metilación en estos dos genes se produce de forma exclusiva en los tumores (Figura 59)

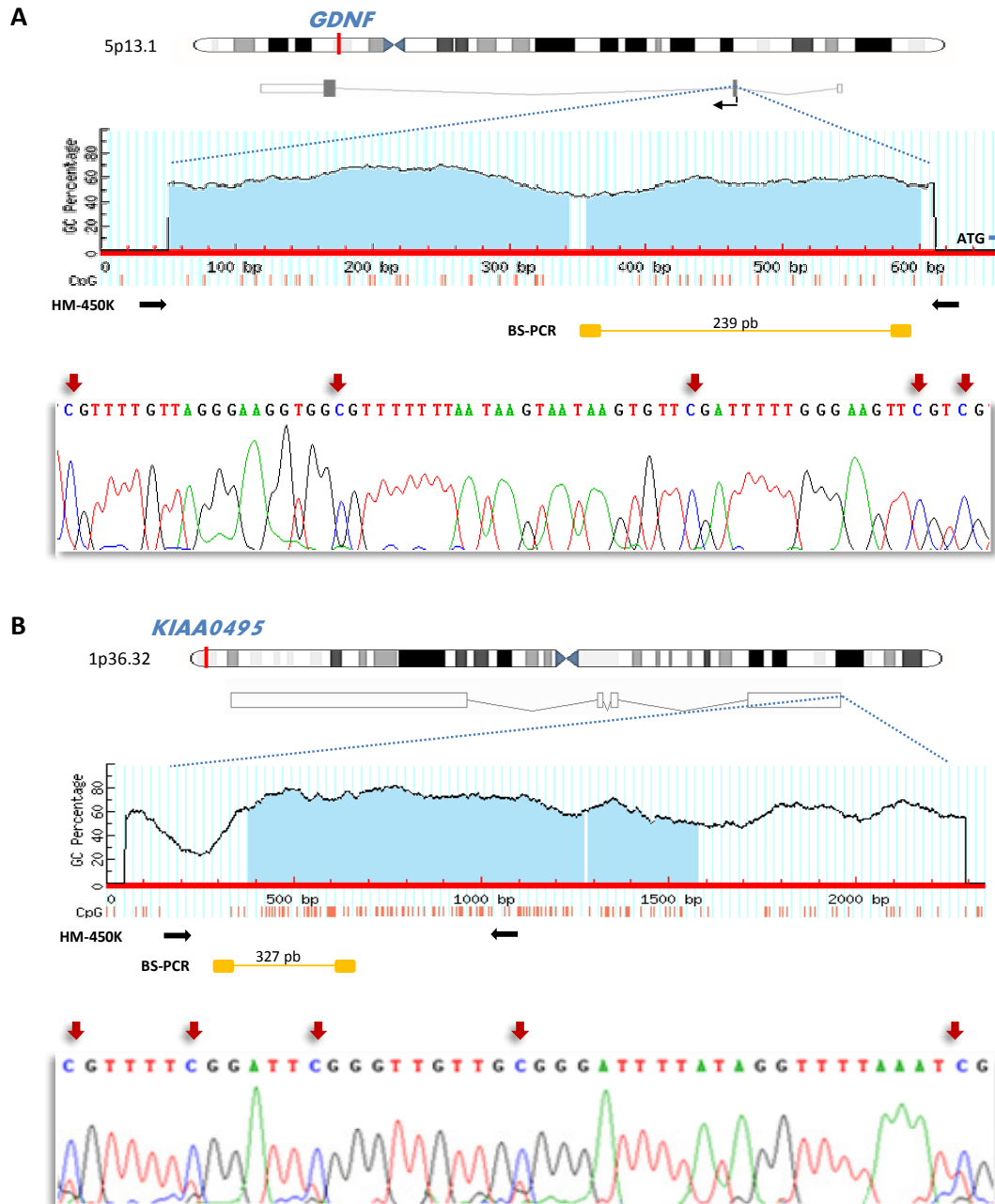


Figura 58. Análisis del promotor de *GDNF* y *KIAA0495* mediante secuenciación del ADN convertido con bisulfito sódico en dos muestras con *IDH* mutado. Las islas CpG se representan en azul y cada sitio CpG con líneas rojas. La región estudiada con el microarray HM-450K se indica entre flechas negras, mientras los primers y la zona analizada mediante BS-PCR y posterior secuenciación se indican en naranja. Se muestra el inicio de la transcripción (ATG) y su dirección. **(A)** Se detecta la metilación bialélica del gen *GDNF* en 5 CpGs (flecha roja) de la región seleccionada. **(B)** Se observa el alelo metilado (C) y el no metilado (T) en 5 sitios CpG dentro de la región promotora de *KIAA0495* (flecha roja).

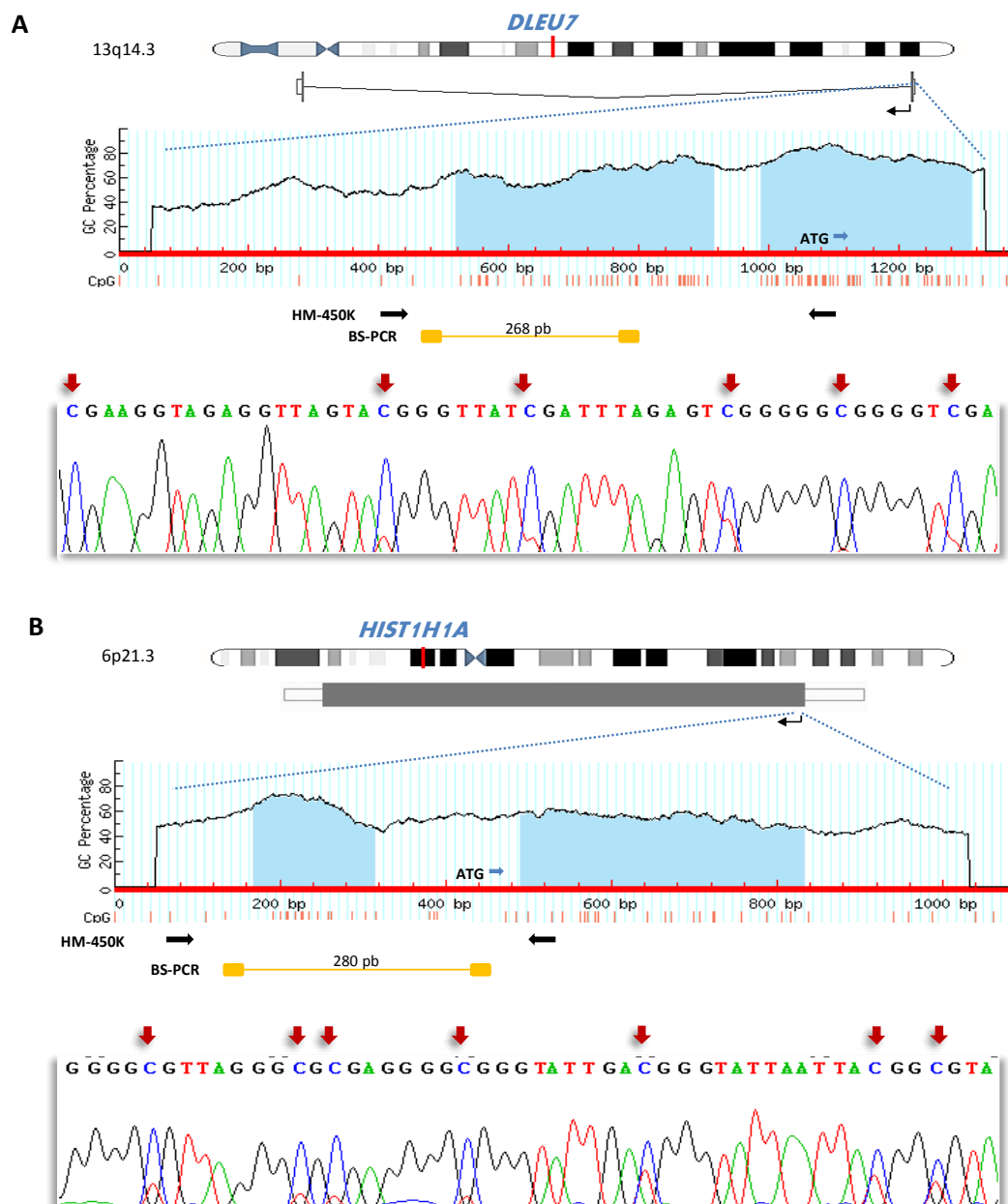


Figura 59. Análisis del promotor de *DLEU7* y *HIST1H1A* mediante secuenciación del ADN convertido con bisulfito sódico en dos muestras tumorales con *IDH* wt. Las islas CpG se representan en azul y cada sitio CpG con líneas rojas. La región estudiada con el microarray HM-450K se indica entre flechas negras, mientras los primers y la zona analizada mediante BS-PCR y posterior secuenciación se indican en naranja. Se muestra el inicio de la transcripción (ATG) y su dirección. **(A)** Se detecta el alelo metilado (C) y el no metilado (T) del gen *DLEU7* en 6 CpGs (flecha roja) de la región seleccionada. **(B)** dentro de la región promotora de *HIST1H1A* se observa el alelo metilado (C) y el no metilado (T) en 7 sitios CpG (flecha roja).

10. PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA EN TUMORES OLIGODENDROGLIALES

10.1. Perfiles de expresión asociados al estado mutacional de *IDH* y a la pérdida de 1p/19q

Para analizar el posible efecto de la metilación en la expresión génica, se analizaron los datos de expresión génica en 25 TOs (8 OD grado II, 6 OD grado III y 3 OA II, 8 OA III) de los cuales 16 estaban incluidos también en el array de metilación.

En primer lugar, la comparación de los perfiles de expresión de los TOs con respecto al estado mutacional de *IDH* identificó un total de 103 genes diferencialmente expresados (GDE) (correspondientes a 109 sondas) entre los tumores *IDH* mutado (17 casos) y los wild-type (8 casos). De estos genes, 66 estaban sobre-expresados (64,1 %) y 37 (35,9%) reprimidos más de 2 veces (Fold-change >2) en aquellos con mutación en *IDH* ($q < 0,05$) (Tabla 22). Algunos de los genes significativamente sobreexpresados en tumores *IDH* mutados fueron *OLIG1*, *KLRC4*, *KLRC2* y *SMOC1* entre otros, mientras también encontramos algunos genes con niveles de expresión más bajos en este grupo (*ENC1*, *MOXD1*, *PDGFA*, *FKBP9*, *SOCS2*, *VASN* y *VAV3*).

Tabla 22. Genes diferencialmente expresados entre tumores *IDH* mutados y wild-type, mostrando los más significativos ($q < 0,05$) y con un fold-change > 2 (FC). Los genes sobreexpresados en tumores *IDH* mutado se muestran en rojo y en verde los reprimidos.

SOBREEXPRESADOS EN TUMORES <i>IDH</i> MUTADO				
Gen	Descripción	Citobanda	q-valor	FC
<i>KLRC2</i>	<i>killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 2</i>	12p13.2	0,034	13,73
<i>SMOC1</i>	<i>SPARC related modular calcium binding 1</i>	14q24.2	0,011	9,11
<i>KLRC4</i>	<i>killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 4</i>	12p13.2	0,011	8,96
<i>OLIG1</i>	<i>Oligodendrocyte transcription factor 1</i>	21q22.11	0,036	6,11
<i>CR601196</i>	<i>CR601196</i>	10q21.1	0,033	5,22
<i>RAB3IP</i>	<i>RAB3A interacting protein</i>	12q15	0,021	5,04
<i>ANGPTL2</i>	<i>Angiopoietin-like 2</i>	9q33.3	0,022	4,96
<i>AKR1C3</i>	<i>Aldo-keto reductase family 1, member C3</i>	10p15.1	0,002	4,95
<i>TCF12</i>	<i>Transcription factor 12</i>	15q21.3	0,039	4,47
<i>DLL1</i>	<i>Delta-like 1</i>	6q27	0,036	4,02
<i>SULF2</i>	<i>Sulfatase 2</i>	20q13.12	0,027	3,66
<i>BF129169</i>	<i>BF129169</i>	16p13.3	0,013	3,47
<i>BC073935</i>	<i>BC073935</i>	12p13.31	0,024	3,45
<i>RP11-35N6.1</i>	<i>Plasticity related gene 3</i>	9q31.1	0,049	3,32
<i>IFIT2</i>	<i>Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2</i>	10q23.31	0,040	3,26
<i>THC2613107</i>	<i>THC2613107</i>	15q21.3	0,033	3,07
<i>FCHSD2</i>	<i>FCH and double SH3 domains 2</i>	11q13.4	0,039	2,86
<i>C20orf19</i>	<i>Chromosome 20 open reading frame 19</i>	20p11.23	0,008	2,86

SNHG1	<i>Small nucleolar RNA host gene 1</i>	11q12.3	0,018	2,80
AF086044	AF086044	12q24.31	0,046	2,79
POLR2F	<i>Polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide F</i>	22q13.1	0,046	2,65
THC2534222	THC2534222	9p12	0,039	2,64
C17orf45	<i>Chromosome 17 open reading frame 45</i>	17p11.2	0,011	2,61
TPM1	<i>Tropomyosin 1 (alpha)</i>	15q22.2	0,046	2,60
TNFRSF21	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21</i>	6p12.3	0,047	2,58
DIAPH2	<i>Diaphanous homolog 2</i>	Xq21.33	0,044	2,56
ARHGAP12	<i>Rho GTPase activating protein 12</i>	10p11.22	0,036	2,42
OPHN1	<i>Oligophrenin 1</i>	Xq12	0,024	2,40
ASB13	<i>Ankyrin repeat and SOCS box-containing 13</i>	10p15.1	0,027	2,36
C10orf56	<i>Chromosome 10 open reading frame 56</i>	10q22.3	0,033	2,35
RPS13	<i>Ribosomal protein S13</i>	11p15.1	0,011	2,33
RPS24	<i>Ribosomal protein S24</i>	10q22.3	0,028	2,30
LOC731731	<i>Similar to NAP-1-related protein</i>	11q24.2	0,021	2,25
THC2500237	THC2500237	2q21.2	0,036	2,21
KIAA1166	<i>Zinc finger, C4H2 domain containing</i>	Xq11.1	0,027	2,18
ARL3	<i>ADP-ribosylation factor-like 3</i>	10q24.32	0,019	2,17
RPS12	<i>Ribosomal protein S12</i>	6q23.2	0,036	2,14
NSBP1	<i>Nucleosomal binding protein 1</i>	Xq21.1	0,034	2,13
RBM17	<i>RNA binding motif protein 17</i>	10p15.1	0,042	2,13
ZNF22	<i>Zinc finger protein 22</i>	10q11.21	0,047	2,12
DLG5	<i>Discs, large homolog 5</i>	10q22.3	0,005	2,05
EPC1	<i>Enhancer of polycomb homolog 1</i>	10p11.22	0,040	2,05

REPRIMIDOS EN TUMORES IDH MUTADO				
Gen	Descripción	Citobanda	q-valor	FC
MOXD1	<i>Monoxygenase, DBH-like 1</i>	6q23.2	0,004	12,19
ENST00000368025	ENST00000368025	1q23.3	0,002	8,45
ENC1	<i>Ectodermal-neural cortex (with BTB-like domain)</i>	5q13.3	0,034	7,76
OCIAD2	<i>OCIA domain containing 2</i>	4p12	0,011	6,97
VASN	<i>Vasorin</i>	16p13.3	0,034	6,74
VAV3	<i>Vav 3 oncogene</i>	1p13.3	0,019	5,60
SOCS2	<i>Suppressor of cytokine signaling 2</i>	12q22	0,034	4,60
RAB34	<i>RAB34, member RAS oncogene family</i>	17q11.2	0,011	4,28
KIAA1522	KIAA1522	1p35.1	0,004	4,22
C5orf25	<i>Chromosome 5 open reading frame 25</i>	5q35.2	0,026	4,06
KBTBD9	<i>Kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 9</i>	2p24.1	0,046	4,02
FKBP9	<i>FK506 binding protein 9, 63 kDa</i>	7p14.3	0,011	3,91
ZDHHC23	<i>Zinc finger, DHHC-type containing 23</i>	3q13.31	0,018	3,60
MSN	<i>Moesin</i>	Xq11.1	0,033	3,26
CHAF1B	<i>Chromatin assembly factor 1, subunit B (p60)</i>	21q22.13	0,024	3,13
OPLAH	<i>5-oxoprolinase (ATP-hydrolysing)</i>	8q24.3	0,036	3,06
MFAP4	<i>Microfibrillar-associated protein 4</i>	17p11.2	0,036	3,02
RPL39L	<i>Ribosomal protein L39-like</i>	3q27.3	0,048	2,97
DCTD	<i>dCMP deaminase</i>	4q35.1	0,027	2,92
RAB3D	<i>RAB3D, member RAS oncogene family</i>	19p13.2	0,034	2,77
PDGFA	<i>Platelet-derived growth factor alpha polypeptide</i>	7p22.3	0,036	2,70

FZD1	Frizzled homolog 1	7q21.13	0,004	2,59
SYNC1	Syncoilin, intermediate filament protein	1p35.1	0,047	2,47
ATP1A1	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 1 polypeptide	1p13.1	0,033	2,43
MAP3K6	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 6	1p36.11	0,027	2,43
ENSA	Endosulfine alpha	1q21.2	0,011	2,40
ATP1A3	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 3 polypeptide	19q13.2	0,018	2,28
ATP2B1	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 1	12q21.33	0,047	2,15

Por otro lado, comparando los tumores con o sin pérdida de 1p/19q (10 y 15 casos, respectivamente) se identificaron 37 GDE (40 sondas) ($q < 0,05$). Del total, 28 (75,7%) estaban reprimidos en los casos con codeleción de 1p/19q, y curiosamente, casi todos (27/28) se localizaban en los cromosomas 1p y 19q (Tabla 23). En cambio, los genes regulados positivamente no se concentraban en esas regiones y algunos como **DRAM**, **TMEM97** y **CREB3L4** eran reguladores de apoptosis, de crecimiento celular o de la transcripción, respectivamente.

Tabla 23. Genes diferencialmente expresados entre tumores con o sin codeleción de 1p/19q ($q < 0,05$). Los genes sobreexpresados se muestran en rojo, por el contrario, los reprimidos en color verde.

SOBREEXPRESADOS EN TUMORES CON PÉRDIDA DE 1p/19q				
Gen	Descripción	Citobanda	q-valor	FC
DRAM	Damage-regulated autophagy modulator	12q23.2	0,016	2,48
TMEM97	Transmembrane protein 97	17q11.2	0,022	2,44
CREB3L4	cAMP responsive element binding protein 3-like 4	1q21.3	0,040	2,41
AK056245	AK056245	3q26.32	0,042	2,15
FDXR	Ferredoxin reductase	17q25.1	0,036	2,06
LOC257396	Hypothetical protein LOC257396	5q11.2	0,044	1,71
C12orf47	Chromosome 12 open reading frame 47	12q24.12	0,032	1,65
AK130486	AK130486	12q24.23	0,042	1,55
LOC645676	Hypothetical LOC645676	1q22	0,029	1,52
REPRIMIDOS EN TUMORES CON PÉRDIDA DE 1p/19q				
Gen	Descripción	Citobanda	q-valor	FC
FNBP1L	Formin binding protein 1-like	1p22.1	0,011	4,44
DOCK7	Dedicator of cytokinesis 7	1p31.3	0,016	2,70
MFN2	Mitofusin 2	1p36.22	0,022	2,05
C1orf119	Chromosome 1 open reading frame 119	1p13.3	0,011	2,02
LRRC42	Leucine rich repeat containing 42	1p32.3	0,016	1,98
FBXO42	F-box protein 42	1p36.13	0,001	1,94
GPBP1L1	GC-rich promoter binding protein 1-like 1	1p34.1	0,013	1,89
KIAA2013	KIAA2013	1p36.22	0,020	1,81
LOC646547	Similar to DnaJ homolog, subfamily C, member 8	3q22.3	0,017	1,81
PHF13	PHD finger protein 13	1p36.31	0,033	1,72
CCNL2	Cyclin L2	1p36.33	0,049	1,72
RRAGC	Ras-related GTP binding C	1p34.3	0,017	1,67
PPP1R8	Protein phosphatase 1, regulatory subunit 8	1p35.3	0,036	1,69
FRAP1	FK506 binding protein 12-rapamycin associated protein 1	1p36.22	0,009	1,69
C1orf149	Chromosome 1 open reading frame 149	1p34.3	0,011	1,68

FAM40A	<i>Family with sequence similarity 40, member A</i>	1p13.3	0,002	1,68
POP4	<i>Processing of precursor 4, ribonuclease P/MRP subunit</i>	19q12	0,040	1,67
FAM54B	<i>Family with sequence similarity 54, member B</i>	1p36.11	0,011	1,66
DNAJC	<i>DnaJ homolog, subfamily C, member 8</i>	1p35.3	0,011	1,62
ZMYM4	<i>Zinc finger, MYM-type 4</i>	1p34.3	0,040	1,59
ZNF580	<i>Zinc finger protein 580</i>	19q13.42	0,040	1,55
DMAP1	<i>DNA methyltransferase 1 associated protein 1</i>	1p34.1	0,036	1,55
C1orf52	<i>Chromosome 1 open reading frame 52</i>	1p22.3	0,022	1,54
LOC644096	<i>Hypothetical protein LOC644096</i>	19q13.12	0,040	1,54
PUM1	<i>Pumilio homolog 1</i>	1p35.2	0,033	1,51
NOL9	<i>Nucleolar protein 9</i>	1p36.31	0,017	1,50
C1orf123	<i>Chromosome 1 open reading frame 123</i>	1p32.3	0,042	1,48
EYA3	<i>Eyes absent homolog 3</i>	1p35.3	0,016	1,46

10.2. Perfiles de expresión asociados a los distintos perfiles de metilación CIMP

Con el fin de determinar los patrones de expresión génica asociados al estado CIMP, se clasificaron los casos según los perfiles de metilación obtenidos, o teniendo en cuenta la relación entre los patrones de metilación y la mutación de *IDH* y la codeleción de 1p/19q.

La comparación de los tres grupos CIMP (CD-CIMP+, 10 casos; CIMP+, 7 casos y 8 CIMP-) mediante un test de ANOVA determinó 139 GDE (correspondientes a 147 sondas) con expresión significativamente diferente entre los tres perfiles de metilación (Figura 60).

Este análisis mostró que los casos con perfiles CD-CIMP+ y CIMP+ compartían un perfil de expresión específico de 76 genes regulados de forma distinta a los tumores CIMP-. Algunos de los genes con niveles más altos de expresión en CIMP- fueron *ENC1*, *MOXD1*, *PDGFA*, *FKBP9* y *VAV3*, mientras que *RIOK2*, *TSG101*, *KLRC4* y *SMOC1*, entre otros, presentaron niveles de expresión más bajos en este grupo. Esta firma molecular podría estar relacionada con el estado mutacional del gen *IDH* (Tabla 22), debido a que el perfil de expresión de estos genes es igual entre los CIMP+ y CD-CIMP+ (tumores *IDH* mutados) (Figura 60).

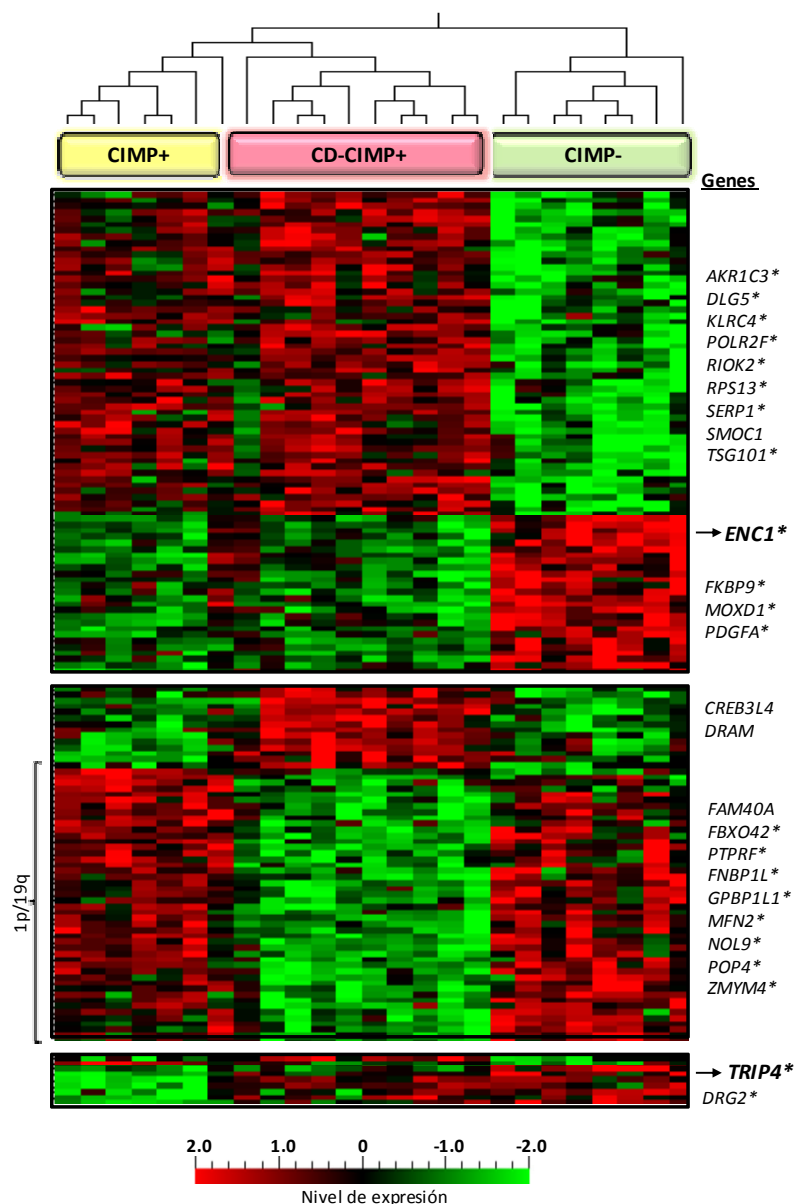


Figura 60. 139 genes diferencialmente expresados entre los tres grupos CIMP (n=25; $q < 0,08$). Los genes sobreexpresados se muestran en rojo, por el contrario, los reprimidos en color verde. *Genes validados en el estudio de Turcan y colaboradores. La pérdida de expresión de los genes *ENC1* y *TRIP4* se asoció con metilación.

Por otra parte, los grupos CIMP+ y CIMP- también compartían un patrón de expresión de 56 genes, la mayoría de los cuales estaban reprimidos en tumores CD-CIMP+ (36 genes). Estos genes reprimidos en el grupo CD-CIMP+ se localizaban en 1p y 19q (35/36), sugiriendo que el perfil transcriptómico característico de los tumores CD-CIMP+ está causado principalmente por la pérdida cromosómica de 1p/19q (Tabla 23). En el cromosoma 1 se encontraron genes como *FBXO42*, *FAM40A*, *FNBP1L*, *NFYC*, *NOL9*, *PTPRF*, mientras en el 19 estaban reprimidos *POP4*, *ZNF580*, *C19orf49* y *LOC64409*. Además, también se encontraron algunos genes sobreexpresados como *DRAM*, siendo casi todos estos genes los identificados en la comparación previa entre tumores con y sin codeleción de 1p/19q.

Por último, aunque los tumores CIMP+ compartieron los perfiles de expresión de algunos genes, tanto con el subgrupo CD-CIMP+ o con los CIMP-, también mostraron un patrón exclusivo en la expresión génica de 7 genes, que implicaba la represión de los genes *TRIP4* (juega un papel importante en la activación de NF-κB), *DRG2* (regulación del crecimiento celular y la diferenciación), o *CRELD1* (adhesión celular), entre otros (Tabla 24 y Figura 60).

Tabla 24. Perfil de expresión de tumores con perfil CIMP+. En verde genes reprimidos y en rojo los sobreexpresados.

GENES EXCLUSIVOS DEL PERFIL CIMP+			
Gen	Descripción	Citobanda	FC (CIMP+ vs otros)
<i>TRIP4*</i>	<i>Thyroid hormone receptor interactor 4</i>	15q22.31	2,91
<i>C1orf64</i>	<i>Chromosome 1 open reading frame 64</i>	1p36.13	2,90
<i>FLJ11286</i>	<i>FLJ11286</i>	19p13.2	2,15
<i>DRG2*</i>	<i>Developmentally regulated GTP binding protein 2</i>	17p11.2	2,13
<i>ASL*</i>	<i>Argininosuccinate lyase</i>	7q11.21	2,07
<i>CRELD1*</i>	<i>Cysteine-rich with EGF-like domains 1</i>	3p25.3	1,87
<i>THC2533242</i>	<i>THC2533242</i>	9q12	1,75

* Genes validados en el array de expresión realizado por Turcan y colaboradores.

10.3. Correlación entre la expresión y los perfiles de metilación en TO

Para el estudio de la **correlación entre la metilación y la expresión**, se seleccionaron los genes hipermetilados en la región promotora de los casos *IDH* mutados o con codeleción de 1p/19q y se analizaron los niveles medios de expresión entre los tumores *IDH* mutados o los 1p/19q codelecionados, respectivamente. Los resultados mostraron que únicamente existía una correlación entre la metilación y la pérdida de expresión en aproximadamente el **50% de los genes** (el 51.5% o 48.5% de los genes hipermetilados en tumores con mutación de *IDH* o con codeleción de 1p/19q, respectivamente, se encontraron reprimidos). Algunos de los genes que mostraron esa correlación fueron *KIAA0495*, *PRDX1* y *RBP1*, metilados en tumores *IDH* mutados. También se encontraron genes sobreexpresados en tumores con mutación de *IDH*, como *SMOC1* y *DLL3* (Tabla 22), que correlacionaron con la pérdida de metilación en el cuerpo del gen (Figura 48).

Por otro lado, cabe destacar, que la represión del gen *ENC1* (*ectodermal neural cortex-1*) en tumores CD-CIMP+ y CIMP+ se asoció con la metilación en su promotor en estos dos grupos de tumores, no siendo así en tumores CIMP- o en los controles no tumorales (Figura 60 y 61). Así mismo, el gen *TRIP4* (*thyroid hormone receptor interactor 4*), estaba reprimido y metilado exclusivamente en los tumores con perfil CIMP+ (Tabla 24 y Figura 61). Por lo tanto, aunque la correlación negativa entre la

expresión génica y la metilación de los genes no se observó de manera general, sí que se encontraron algunos ejemplos notables de correlación.

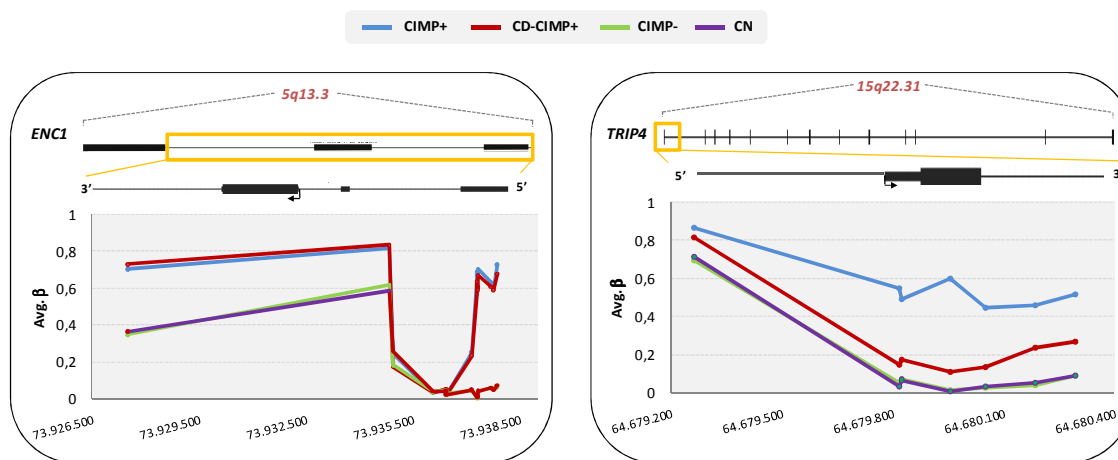


Figura 61. Representación de los niveles de metilación en los grupos de tumores según su perfil CIMP y en los controles, de los genes *ENC1* (metilado y reprimido en tumores CIMP+ y CD-CIMP+) y del gen *TRIP4* (metilado y reprimido en tumores CIMP+).

10.4. Validación de los perfiles de expresión génica en TO

10.4.1. Base de datos externa

Para validar los resultados de la expresión génica, se utilizaron los datos transcriptómicos de 48 gliomas (3 OA, 26 OD y 19 As con datos pareados de metilación que previamente se habían utilizado para validar los grupos CIMP de metilación (13 CIMP+, 23 CD-CIMP+ y 12 CIMP-) de la serie de Turcan et al.

La comparación de las muestras se realizó de acuerdo a su estado CIMP mediante un test de ANOVA ($q < 0,05$) y se identificaron 2.253 genes diferencialmente expresados entre los tres grupos (la plataforma de expresión incluía 22.277 sondas). La mayoría de los GDEs identificados por nuestro grupo también se encontraban en este estudio, dando validez a los resultados. Los genes compartidos por el presente estudio y los de Turcan *et al.* se indican en la Figura 60 y en la tabla 24 mediante un asterisco.

10.4.2. Validación de la expresión mediante qRT-PCR

Los resultados obtenidos mediante los estudios de *microarrays* de expresión génica se validaron en una serie de 22 tumores oligodendrogliales (12 OD y 10 OA) por PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR). Para llevarlo a cabo, se seleccionaron los genes más relevantes identificados con expresión diferencial significativa en las comparaciones de tumores *IDH* mutado (n=16) frente a *IDH* wild-type

(n=6), o tumores con codeleción de 1p/19q (n=10) frente 1p/19q intacto (n=12). De este modo, se analizó la expresión de los genes *TSG101*, *DRG2*, *ENC1*, *DRAM*, *TRIP4*, *FNBP1L*, *FBXO42*, *PTPRF*, *MOXD1*, *RIOK2* y *KIAA0495* (Tabla 25).

Tabla 25. Genes diferencialmente expresados (GDE) analizados mediante qRT-PCR.

GDE de acuerdo al estado de <i>IDH</i>			GDE de acuerdo al estado de 1p/19q		
Genes	FC <i>IDH</i> mut/wt	P valor	Genes	FC Codel/No codel	P valor
<i>TSG101</i>	2,17	0,04	<i>PTPRF</i>	3,78	0,01
<i>ENC1</i>	2,20	0,33	<i>DRAM</i>	2,67	0,03
<i>MOXD1</i>	12	0,01	<i>FBXO42</i>	2,36	0,005
<i>KIAA0495</i>	2,86	0,07	<i>TRIP4</i>	2,46	0,04
<i>RIOK2</i>	2,25	0,02	<i>DRG2</i>	2,40	0,04
			<i>FNBP1L</i>	2,46	0,06
			<i>RIOK2</i>	2,13	0,02

En azul se muestran los genes validados. FC corresponde a la diferencia de expresión entre las medias (*IDH* mutado vs wt o 1p/19q codelecionado vs intacto) expresado en escala logarítmica.

Los análisis de qRT-PCR mostraron niveles de expresión diferencial entre los grupos *IDH* mutado o wt para los genes *KIAA0495*, *ENC1*, *MOXD1*, *RIOK2* y *TSG101*, con valores significativos ($P < 0,05$) para los tres últimos (Figura 62). Los genes *KIAA0495*, *ENC1* y *MOXD1* tenían niveles más bajos de expresión en tumores con *IDH* mutado, mientras *RIOK2* y *TSG101* presentaban niveles más altos en tumores *IDH* mutado que en tumores con *IDH* wild-type.

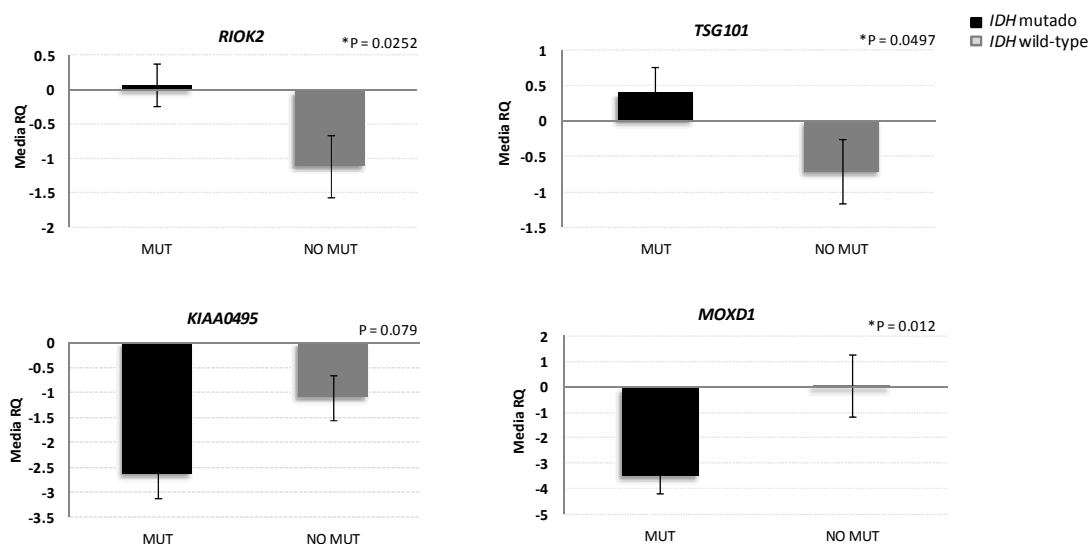


Figura 62. Resultados obtenidos mediante el ensayo qRT-PCR del análisis de la expresión génica (media RQ) de algunos de los genes estudiados para los tumores *IDH* mutados y *IDH* wild-type.* P-valor significativo.

En la comparación de los niveles de expresión medidos mediante qRT-PCR en los casos con o sin pérdida combinada de 1p/19q se observaron niveles de expresión significativamente más bajos para los genes *DRAM*, *DRG2*, *RIOK2* y *TRIP4* en tumores sin codeleción de 1p/19q. (Figura 63). Mientras, los genes *FBXO4* y *PTPRF*, presentaron niveles significativamente más bajos de expresión en aquellos tumores con pérdida combinada de 1p/19q.

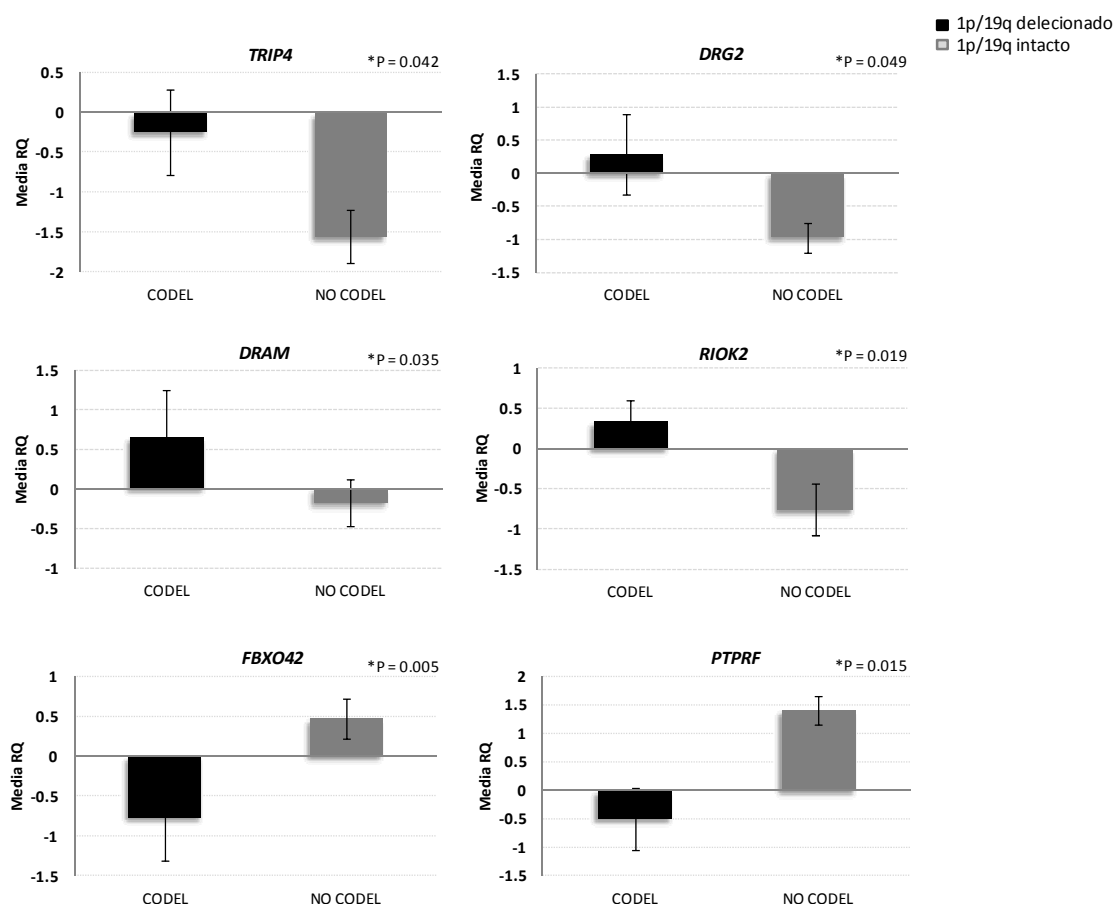


Figura 63. Resultados obtenidos mediante el ensayo qRT-PCR del análisis de la expresión génica de alguno de los genes estudiados (media RQ) para los tumores con y sin pérdida combinada de 1p/19q.* P-valor significativo.

Debido al reducido número de casos con perfiles CIMP+ estudiados mediante qRT-PCR, no se pudieron realizar las comparaciones estadísticas (ANOVA) de la expresión génica de los genes seleccionados de acuerdo a sus perfiles CIMP.

11. ESTUDIO DE LA METILACIÓN DEL GEN MGMT EN GLIOMAS

11.1. Distribución de la metilación de los sitios CpG de *MGMT* y su relación con supervivencia

La plataforma Illumina HM-450K permitió realizar el análisis de metilación específicamente en el gen completo de *MGMT* (*O*-6-methylguanine-DNA methyltransferase), examinando 154 CpGs de 247 muestras (46 TO de nuestra serie y 201 gliomas de las series de validación utilizadas para el perfil de metilación, TCGA y Turcan). De estas sondas, 25 se ubicaban dentro de la región promotora (Figura 64) mientras que las otras 129 se encontraban dentro del cuerpo del gen. La agrupación jerárquica de los 154 sitios CpG del gen *MGMT* identificó dos grupos de sondas diferentes con patrones de metilación similares entre las muestras. El primer grupo incluía aquellas sondas localizadas dentro del **cuerpo del gen**, así como también la primera parte de la **región promotora (CpG 1 a 10)**. En el segundo grupo se agrupaban los sitios **CpG 13 a 27 del promotor**, que correspondían a la isla CpG del gen (Figura 65).

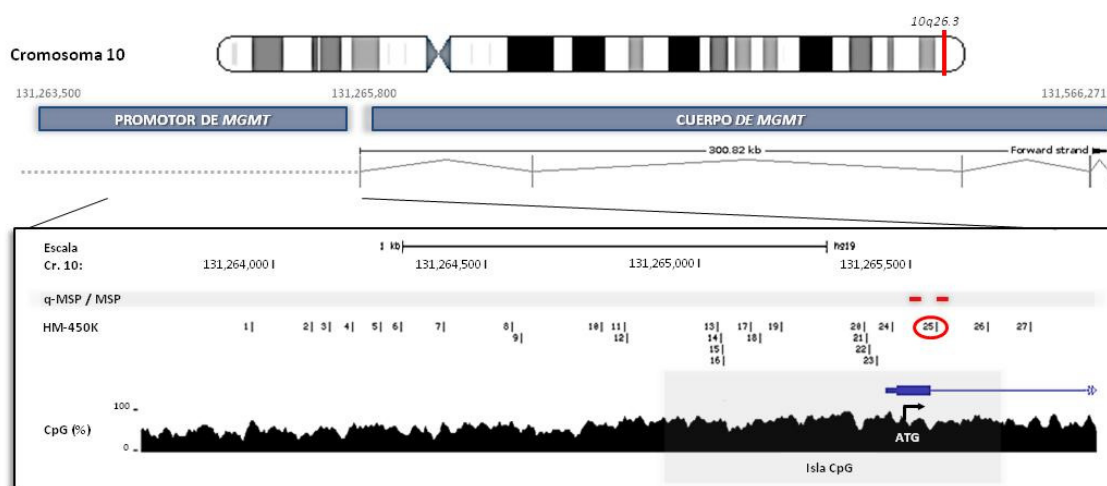


Figura 64. Esquema del gen *MGMT* que muestra los sitios CpG de la región promotora analizados por la plataforma HM-450K (el círculo rojo indica la CpG 25) y la localización de la isla CpG. También se indican los cebadores utilizados para MSP/qMSP (barras rojas).

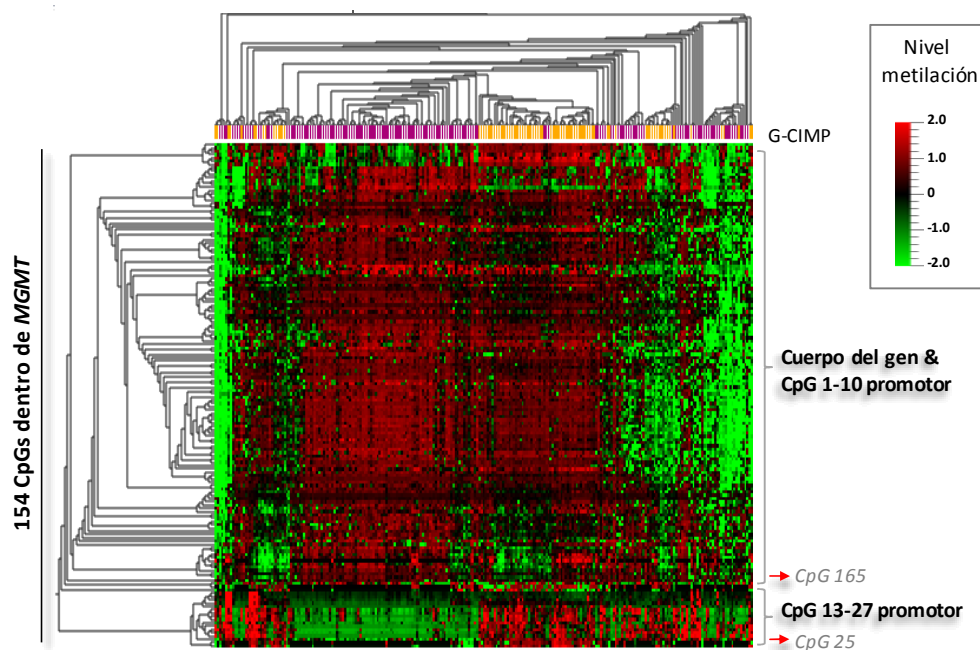


Figura 65. Agrupación jerárquica no supervisada de las 154 CpGs del gen *MGMT* y de las 247 muestras incluidas en el análisis. Las muestras con un perfil G-CIMP+ se indican en color naranja mientras que las que tenían un perfil G-CIMP- se muestran en lila.

Se realizó un análisis de supervivencia Cox multivariante mediante el programa Pomelo II usando los datos de metilación de cada sonda CpG (154) para estudiar la asociación de la metilación del gen *MGMT* completo con la supervivencia global de los pacientes. Este modelo mostró 22 sondas significativamente asociadas con supervivencia ($FDR < 0,05$), tanto en la región del promotor (10) como en el cuerpo del gen (12), siendo las sondas más significativas la **CpG 25 (cg12981137)** y **CpG 165 (cg07933035)** (Tabla 26). De estas 22 sondas, 12 se validaron en la serie de Van den Bent et al. 2013 (97) mediante un Cox de las 154 sondas localizadas en el gen *MGMT*. Dentro de estas sondas se incluían también la CpG 25 y la CpG 165 (Tabla 26).

Tabla 26. Resultados del análisis Cox multivariante que muestra los sitios CpG más significativamente asociados con la supervivencia de los pacientes. *Sondas validadas en la serie de Van den Bent et al., 2013 (GSE48462)

CpG	Sonda	Localización	FDR
Promotor <i>MGMT</i>			
13*	cg02022136	131265059	0,0014736
14*	cg23998405	131265067	0,0267557
15*	cg01341123	131265071	0,023687
16*	cg25946389	131265073	0,0138057
17	cg14194875	131265137	0,0024268
18	cg00618725	131265159	0,0380012
19	cg12434587	131265209	0,0025637
25*	cg12981137	131265575	0,0014426
26	cg02941816	131265696	0,0025637
27*	cg26201213	131265796	0,0032487
Cuerpo <i>MGMT</i>			
38*	cg23004031	131323903	0,0007202
39	cg07828472	131323986	0,0011728
40*	cg25974017	131324090	0,0132928
43	cg23465978	131330293	0,0014424
44	cg22575127	131330739	0,0051602
111	cg26102564	131424627	0,016389
143	cg01204683	131498456	0,0025637
146	cg11948988	131503290	0,0267557
154*	cg26279216	131506261	0,0007202
163*	cg07554771	131557157	0,0001296
164*	cg11235543	131557193	0,0000631
165*	cg07933035	131557294	0,0000631

En azul las sondas más significativamente asociadas con SG

Teniendo en cuenta los datos de metilación de las dos sondas más significativamente relacionadas con supervivencia, el análisis del promotor en la CpG 25 mostró que 160 tumores (64,8%) tenían esa sonda metilada. Casi todos los tumores G-CIMP+ (CD-CIMP+ y CIMP+ clasificados en el estudio anterior) tenían metilación en la CpG 25 (85 de 88 tumores, 96,6%), aunque también presentaban metilación en esta CpG la mitad de los tumores G-CIMP- (75 de 159, 47,2%); previamente llamados CIMP- (Tabla 27). Por otro lado, la metilación de la CpG 165 situada en el cuerpo del gen (cg07933035) se observó en 163 casos (63%). De manera similar a la CpG 25, todos los tumores G-CIMP+ estaban metilados en la CpG 165, así como también lo estaban alrededor del 50% de los tumores G-CIMP- (75/159). Los pacientes menores de 65 años con tumores de bajo grado y un subtipo oligodendroglioma presentaron mayores frecuencias de metilación en el promotor (CpG 25) y el cuerpo (CpG 165) del gen *MGMT* (Tabla 27).

Tabla 27. Resumen de las características clínicas y moleculares de los pacientes de acuerdo al estado de metilación global (G-CIMP), y de la metilación de *MGMT* en el promotor y en el cuerpo del gen. M, metilado; NM, no metilado.

MGMT	G-CIMP (%)		Promotor CpG 25 (%)		Cuerpo CpG 165 (%)		Total
	POS (35,6%)	NEG (64,4%)	M (64,77%)	NM (35,22%)	M (65,99%)	NM (34,01%)	
Subtipo							
As	20 (15)	139 (85)	90 (54,9)	74 (45,1)	89 (54,3)	75 (45,7)	164
OA	10 (53)	9 (47)	14 (73,7)	5 (26,3)	14 (73,7)	5 (26,3)	19
OD	53 (83)	11 (17)	56 (87,5)	8 (12,5)	60 (93,8)	4 (6,3)	64
Grado							
Alto (III/IV)	35 (20)	145 (80)	102 (56,4)	79 (43,6)	100 (55,2)	81 (44,8)	181
Bajo (II)	52 (79)	14 (21)	58 (87,9)	8 (12,1)	63 (95,5)	3 (4,5)	66
G-CIMP							
Positivo	-	-	85 (96,6)	3 (3,4)	88 (100)	0 (0)	88
Negativo	-	-	75 (47,2)	84 (52,8)	75 (47,2)	84 (52,8)	159
Edad*							
<65 años	54 (40)	80 (60)	83 (61,9)	51 (38,1)	91 (67,9)	43 (32,1)	134
≥65 años	4 (2)	49 (98)	30 (56,6)	23 (43,4)	27 (50,9)	26 (49,1)	53
Edad media (rango)	44,5 (18-77)	61 (23-85)	55 (18-85)	59 (23-84)	53 (18-78)	62 (23-85)	-
Mediana SG (meses)	23,57	7,96	12,13	7,69	12,85	7,69	-
Casos	88	159	160	87	163	84	247

11.2. Asociación del estado de metilación de *MGMT* con el perfil G-CIMP y factores clínicos e histopatológicos

El estudio de la posible asociación entre las distintas variables examinadas, mostró que, tanto la metilación en el promotor como en el cuerpo del gen *MGMT* estaban fuertemente asociadas con el estado de G-CIMP+ ($\rho = 0,50$ y $\rho = 0,53$ $P = 0,0001$, respectivamente), así como entre ellas ($\rho = 0,26$ y $P = 0,0001$) (Figura 66).

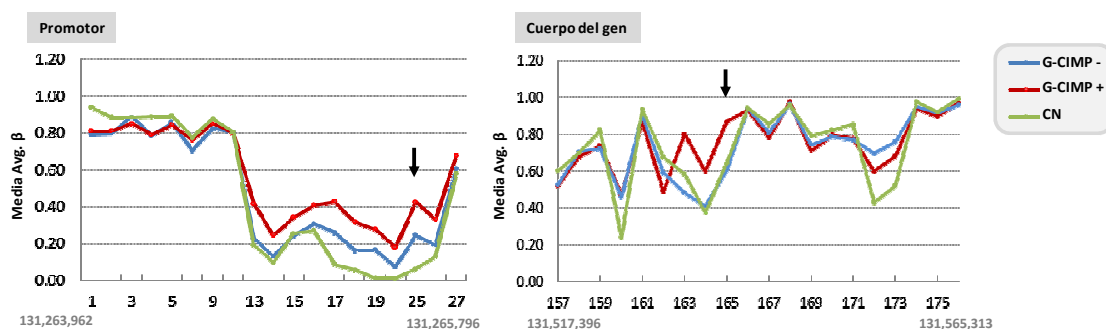


Figura 66. Representación gráfica de los niveles de metilación (media de valores β) para cada grupo de metilación (G-CIMP + y G-CIMP-) y para los controles (cerebro normal, CN) en las dos regiones asociadas con supervivencia, el promotor (a la izquierda) y el cuerpo del gen *MGMT* (derecha). Se observa la asociación entre la metilación del gen *MGMT* y el fenotipo hipermetilador de los tumores (G-CIMP+).

Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier y la significación calculada con el test log-rank, mostraron que los diferentes grupos **G-CIMP**, la metilación de *MGMT* en las **CpGs 25 y 165**, así como los factores clínicos e histopatológicos analizados en esta serie (**subtipo tumoral, grado y edad**) fueron factores significativos de **pronóstico** de SG ($P < 0,0001$). La media de SG fue mayor para pacientes con tumores G-CIMP+ y metilación de *MGMT* (CpG 25 y 165) (Figura 67).

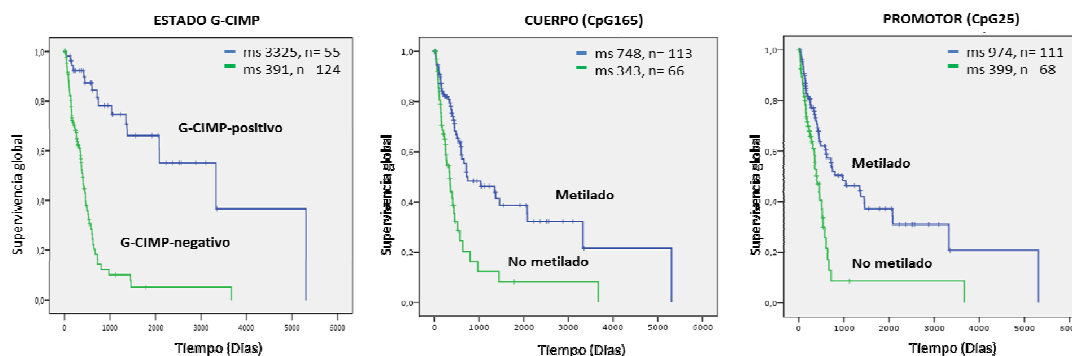


Figura 67. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de los pacientes de acuerdo a la metilación del promotor (CpG 25) y el cuerpo (CpG 165) de *MGMT* en la serie completa ($P < 0,0001$). ms, mediana de la supervivencia (días).

Además, **un análisis Cox multivariante** teniendo en cuenta los factores moleculares y clínicos (subtipo, edad, grado de la OMS, G-CIMP), junto con el estado de metilación de *MGMT* en el promotor (CpG 25) y el cuerpo del gen (CpG 165), mostró que el perfil de metilación global **G-CIMP** era el único **factor con valor pronóstico independiente** de la SG en nuestro modelo ($P < 0,0001$; HR = 6,4 [IC 95%, 3,5 – 11,5]).

Contrariamente a los resultados obtenidos del estudio de la serie completa (casos G-CIMP+ y G-CIMP-) (Figura 66), cuando se seleccionaron únicamente los tumores **G-CIMP-**, las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier no mostraron una asociación significativa entre la metilación de las CpGs 25 y 165 y la supervivencia ($P = 0,717$ y $P = 0,621$, respectivamente) (Figura 68). Además, se observó que el estado de metilación de las CpG 25 y 165 no estaba correlacionado entre sí en este grupo de tumores sin perfil hipermetilador ($\rho = -0,01$; $P > 0,05$) (Tabla 28).

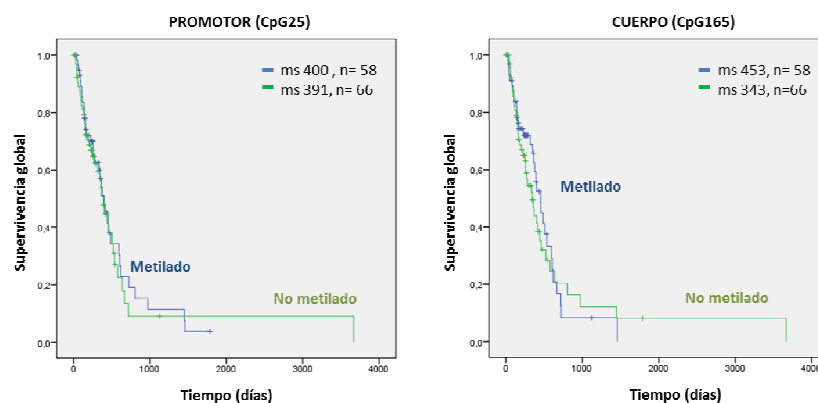


Figura 68. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de los pacientes de acuerdo a la metilación del promotor (CpG 25) y el cuerpo (CpG 165) de *MGMT* en los casos con perfil G-CIMP- ($P > 0,05$). ms, mediana de la supervivencia (días).

Tabla 28. Relación de la metilación en las CpG 25 y 165 de *MGMT* en función del perfil de metilación global. Se observa que la mayor parte de los casos G-CIMP+ tienen *MGMT* también metilado, mientras que en los G-CIMP- se detecta un 50% de casos metilados para *MGMT* y la correlación entre las CpGs 25 y 165 se pierde. M, metilado; NM, no metilado.

G-CIMP +		Cuerpo CpG 165		G-CIMP -		Cuerpo CpG 165	
		M (%)	NM (%)			M (%)	NM (%)
Prom CpG 25	M	85 (96,6)	0	Prom CpG 25	M	35 (22)	40 (25)
	NM	3 (0,04)	0		NM	40 (25)	44 (28)

Un **análisis Cox multivariante** en este grupo de pacientes con tumores **G-CIMP-**, y teniendo en cuenta tanto factores clínicos (subtipo, edad, grado de la OMS) como el estado de metilación de *MGMT* (CpG 25 y CpG 165) mostró que la **edad** era el único **factor pronóstico independiente** ($P < 0,001$; HR = 2,4 [IC 95%, 1,4-4,0]).

Se analizó también el **valor pronóstico de las CpGs** dentro de *MGMT* previamente correlacionadas con supervivencia (CpG 25 y 165) **en función de la edad**. El estudio de las curvas de supervivencia en todos los casos (G-CIMP+ y G-CIMP-) mostró un mejor pronóstico en los tumores con el promotor o con el cuerpo del gen *MGMT* metilado en pacientes menores de 65 años de edad ($P < 0,01$). En pacientes mayores de 65 años, la metilación en el cuerpo de *MGMT* también tuvo valor pronóstico ($P < 0,05$), aunque no la del promotor (Figura 69). Sin embargo, cuando estudiamos el valor pronóstico de la CpG 25 y 165 únicamente en pacientes con tumores **G-CIMP-** (en su mayoría astrocitomas de alto grado), la metilación de ambas CpGs no tenía valor pronóstico en los pacientes jóvenes, mientras que en los pacientes mayores con un perfil de metilación G-CIMP-, el valor pronóstico de la metilación en el cuerpo de *MGMT* era significativo ($P < 0,05$) (Figura 69).

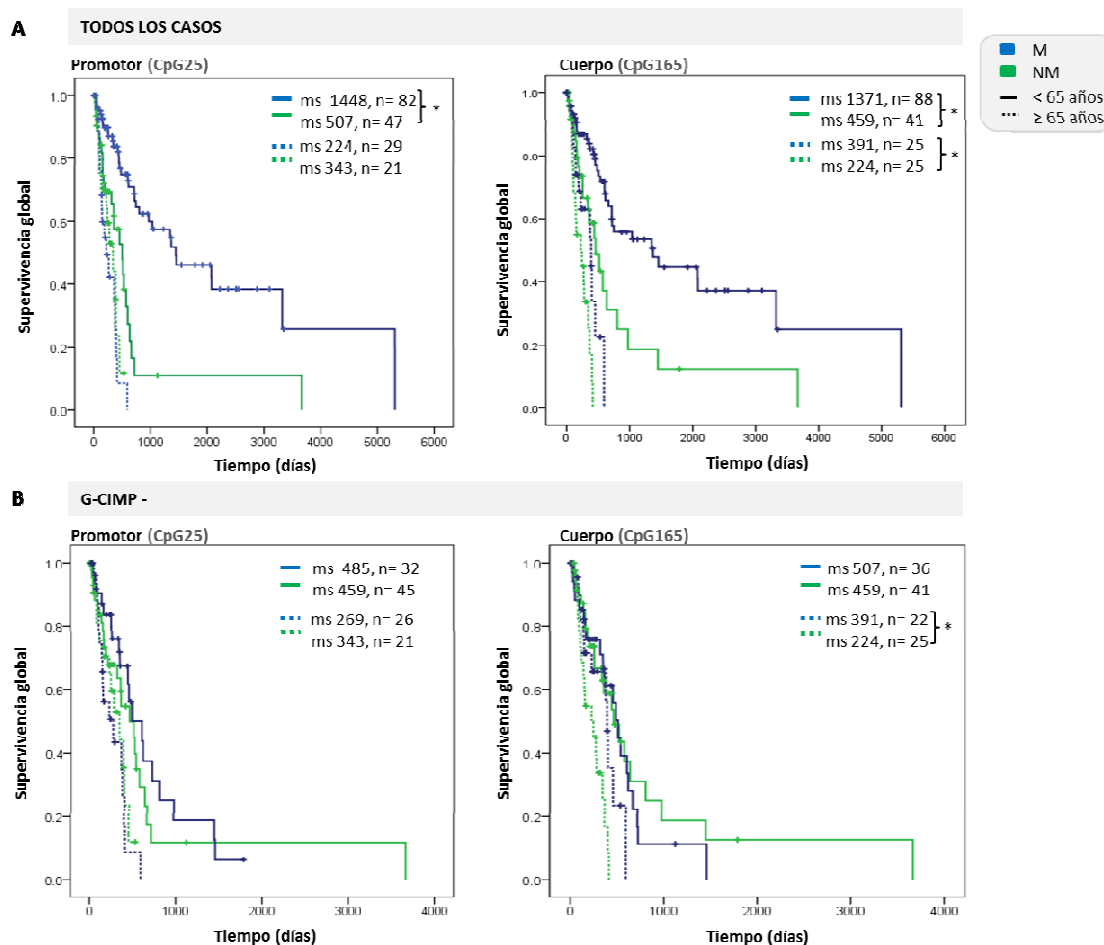


Figura 69. Valor pronóstico, en términos de supervivencia global, del promotor (CpG 25) y el cuerpo de *MGMT* (CpG 165) por grupos de edad (<65 o ≥ 65 años) en **(A)** todos los pacientes con gliomas, o **(B)** específicamente en los pacientes con tumores G-CIMP-. *P < 0,05. M, metilado; NM, no metilado; ms, mediana de la supervivencia (días).

11.3. Validación de la pérdida de valor pronóstico de la CpG 25 en pacientes con tumores G-CIMP- o *IDH wt*

La **pérdida de valor pronóstico** del estado de metilación de *MGMT* teniendo en cuenta la CpG 25 en pacientes con tumores G-CIMP-, se pudo validar en dos series independientes (97, 98).

Analizando los datos del estudio de Van den Bent y colaboradores (97), realizado en **115 tumores oligodendrogiales anaplásicos** (38 OA y 77 OD) tratados con PCV (EORTC-26951) y usando la técnica HM-450K y HM-27K, se detectó el perfil G-CIMP- en 49 de los casos (42,6%). Dentro de este grupo, la metilación en la CpG 25 se identificó en 32 tumores (65,3%). Las curvas de supervivencia realizadas en los tumores G-CIMP- mostraron que no había diferencias significativas en la SG de estos pacientes en función del estado de metilación de la CpG 25 (1,18 años en pacientes metilados vs. 0,96 en los no metilados; P = 0,355) (Figura 70). Sin embargo, cuando se incluye en el análisis las muestras con un

patrón G-CIMP+, esta metilación en *MGMT* sí constituye un factor de pronóstico ($P < 0,0001$), tal y como habíamos detectado anteriormente.

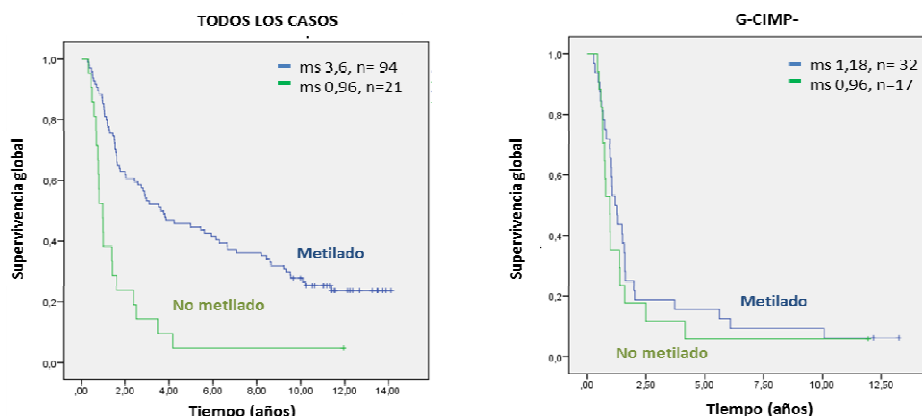


Figura 70. Curva de supervivencia en 115 TO anaplásicos (G-CIMP+ y G-CIMP-) (izquierda) y en 49 tumores G-CIMP- (derecha) según el estado de metilación de *MGMT* (CpG 25). ms, mediana de la supervivencia (años).

Estos mismos resultados se observaron en una serie de **116 GBM primarios e *IDH wt*** recogidos del estudio de Mulholland et al., 2012 (98). En este caso, el dato de la metilación de la CpG 25 dentro del promotor de *MGMT* se obtuvo mediante pirosecuenciación (correspondiente a la CpG 84 del promotor en ese estudio). El 68,7% de los casos presentaba metilación en la CpG 25 y ésta no mostró ser un factor de buen pronóstico, observando una SG de 405 días para los pacientes con metilación y 400 días para los que no tenían ($P = 0,108$) (Figura 73).

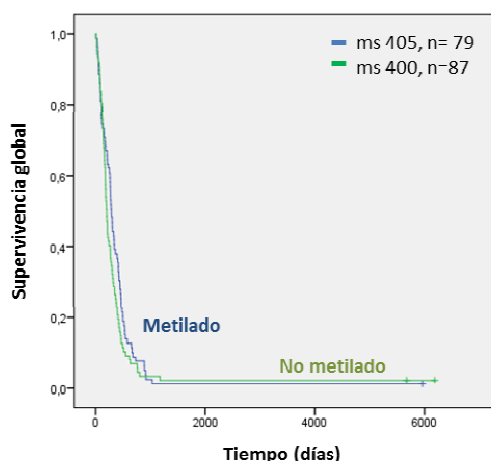


Figura 71. Curva de supervivencia en 166 GBM primarios e *IDH wt* según el estado de metilación de la CpG 25 analizada por pirosecuenciación. ms, mediana de la supervivencia (días).

11.4. Impacto clínico de la metilación del promotor de *MGMT* en pacientes con GBM tratados homogéneamente

Debido a que la mayoría de los tumores con perfil G-CIMP- eran GBM o tumores de alto grado (145/159) y a que el tratamiento que recibieron no fue el mismo para todos los casos (o desconocido en una fracción significativa de los tumores), se seleccionó una serie homogénea e independiente de **68 pacientes con GBM tratados con radioterapia estándar y TMZ concomitante**, para valorar en ellos el efecto pronóstico y/o predictivo de la metilación en *MGMT* (Tabla 29).

Tabla 29. Resultados obtenidos de la metilación del promotor de *MGMT* mediante MSP y qMSP en una serie independiente de 68 pacientes con GBM tratados homogéneamente

MSP / q-MSP	M (47%)	NM (53%)	TOTAL
Mutación de <i>IDH</i>			
<i>Si</i>	0 (0)	3 (6,7)	3
<i>No</i>	22 (45,8)	26 (54,2)	48
Hombre/Mujer	14/18	27/9	41/27
Vivo/ Muerto	9/23	15/21	24/44
Edad			
<60 años	13 (40)	20 (55,5)	33
≥60 años	19 (60)	16 (44,5)	35
Mediana SG (meses)	18,3	18,9	-
Edad media (rango)	63 (24-79)	55 (26-75)	-
CASOS	32	36	68

El estado de metilación del **promotor de *MGMT*** se analizó mediante dos técnicas, **qMSP y MSP** (Figura 72), las cuales analizan una región del promotor que incluye la CpG 25 (Figura 64). La presencia de metilación se identificó en el **47%** (32/68) de las muestras de **GBM** (Tabla 29), una frecuencia similar a la obtenida con el HM-450K para la CpG 25 en los casos G-CIMP- (Tabla 27).

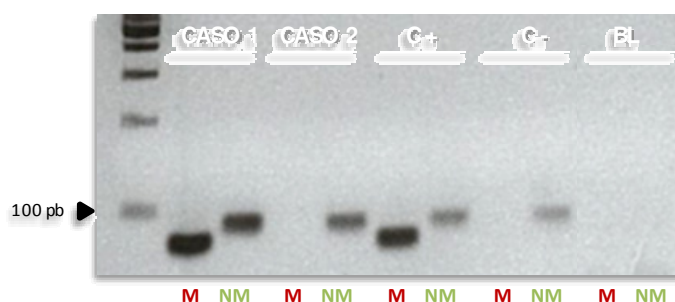


Figura 72. Análisis de la metilación del gen *MGMT* mediante MSP. Para cada muestra se han realizado dos PCRs para la amplificación de los alelos metilados y no metilados, respectivamente (M, metilado y NM, no metilado). Las muestras presentadas en el gel son: Caso 1 (muestra parcialmente metilada), Caso 2 (muestra no metilada), C+ (control parcialmente metilado *in vitro*), C- (control no metilado) y BL que representa el blanco de cada PCR.

En esta serie de **pacientes tratados de forma homogénea**, tampoco se observaron diferencias en la supervivencia global en función del estado de metilación del promotor *MGMT*; ya fuera en conjunto o para cada grupo de edad ($P > 0,05$) (Figura 73). El único **factor pronóstico** de SG fue la **edad**, observándose supervivencias significativamente mejores en los pacientes jóvenes ($P = 0,022$).

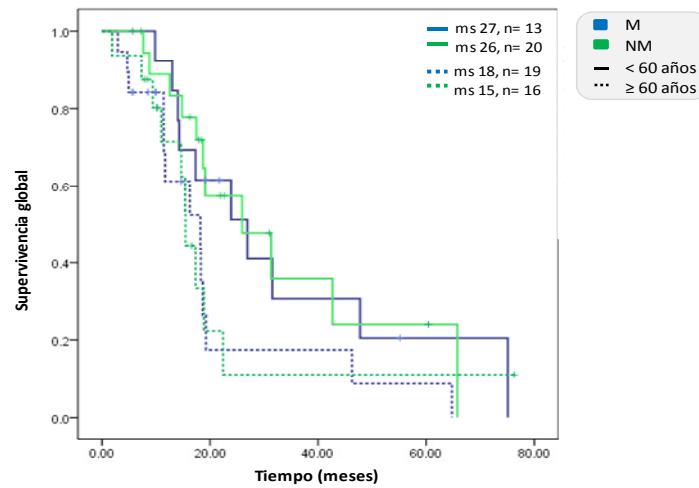


Figura 73. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier de 68 pacientes con GBM tratados con quimio-radio comparando pacientes con tumores *MGMT* metilados y no metilados (mediante MSP y qMSP; región promotora del gen) por grupos de edad (<60y o ≥ 60 años) ($P > 0,05$). ms, mediana de la supervivencia (meses).

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Los gliomas constituyen el 30% de los tumores del Sistema Nervioso Central y presentan un comportamiento clínico y biológico heterogéneo. Actualmente, el diagnóstico de estos tumores se basa exclusivamente en los criterios histopatológicos y clínicos establecidos por la OMS, clasificándose en función de su similitud al tipo de célula tumoral del que se originan y a determinadas características morfológicas que determinan el subtipo y grado histológico. A pesar de ello, en ocasiones esta clasificación no resulta sencilla para el patólogo, concretamente en el caso de los oligoastrocitomas, en los que es difícil determinar una histología mixta entre el oligodendroglioma y el astrocitoma.

En los últimos años, los estudios de Genética Molecular han permitido identificar alteraciones moleculares y vías involucradas en la oncogénesis de los tumores cerebrales, aumentando significativamente nuestro conocimiento y comprensión de los gliomas. Sin embargo, estas alteraciones moleculares que caracterizan a los tumores, no se han incluido todavía en los criterios utilizados en el diagnóstico de los gliomas, ni permiten ofrecer terapias personalizadas.

Biomarcadores con valor diagnóstico

El estudio molecular es complementario al histopatológico y en ocasiones resulta esencial para definir diversas entidades y caracterizar alteraciones oncogénicas específicas de cada tumor, permitiendo identificar marcadores de diagnóstico, entre otros. Las numerosas alteraciones permitirán determinar la patogénesis de los tumores, aunque es importante distinguir aquellas que son centrales para el desarrollo del tumor y que provocan la proliferación celular (*drivers*), de aquellas alteraciones genéticas secundarias o *passengers* que juegan un papel secundario en el desarrollo del tumor.

En el estudio realizado en 272 pacientes con gliomas se analizó el valor diagnóstico de la mutación del gen *IDH*, la pérdida combinada de 1p/19q y la expresión de las proteínas ATRX y p53.

Las mutaciones en el gen *IDH1* fueron frecuentes en gliomas difusos de grado II y III (As 61,2%, OA 68,4%, OD 83,1%), mientras se encontraban prácticamente ausentes en GBMs primarios (1,6%). Además, su frecuencia fue más elevada en tumores de bajo grado que en los de alto grado (85% en tumores de grado II frente al 22% en los de grado III). La mutación de *IDH1* se producía de manera recurrente en el residuo R132 del gen *IDH1*, siendo la substitución del aminoácido R132H la más frecuente, mientras la mutación más frecuente en el gen *IDH2* se produjo en el codón 172 (p.R172K). Las frecuencias observadas en este trabajo, así como el tipo de mutación más recurrente, fueron similares a las descritas en estudios previos, en los que la mutación se detectaba entre el 60-80% de los gliomas difusos de grado II y III y estaban prácticamente ausentes en astrocitomas pilocíticos (grado I) y en GBM

primarios (94, 95, 102). La mutación de *IDH* tiene por lo tanto un valor diagnóstico, ya que permite diferenciar gliosis reactiva de tumor, un astrocitoma pilocítico de un glioma difuso o un GBM primario de uno secundario. En el año 2009, Watanabe y colaboradores fueron los primeros en sugerir que la alteración en los genes *IDH1/2* constituye un evento temprano en la gliomagénesis, ya que tal y como hemos observado, se encuentran frecuencias elevadas de esta alteración en tumores de bajo grado (47). En ese mismo año se propuso que la pérdida de función de esta enzima provocaría entre otras cosas una disminución de la enzima alfa-cetoglutarato, y por tanto produciría una acumulación del factor inducido por la hipoxia tipo 1 (HIF-1 alfa), favoreciendo la angiogénesis (25). Sin embargo, la función de esta mutación en la patogénesis de los gliomas es compleja, como se describirá más adelante, y su relevancia en el desarrollo tumoral todavía requiere estudios adicionales.

Cabe destacar que la alteración genética más frecuente y de mayor importancia en los tumores oligodendrogiales es la pérdida combinada del brazo corto del cromosoma 1 (1p) y del brazo largo del cromosoma 19 (19q) (31-33). El análisis realizado aquí de la codeleción de 1p/19q en tumores que mostraban un componente oligodendrogial reveló un porcentaje elevado de tumores oligodendrogiales puros con codeleción (73,5%), mientras la frecuencia en tumores con histología mixta oligodendrogial y astrocitaria fue algo inferior (21,5%) a la descrita (50%) (103-105). Dicha codeleción no se detectó en astrocitomas, confirmando que esta alteración es una característica molecular exclusiva de los tumores oligodendrogiales. Además, esta alteración está fuertemente asociada con la mutación de *IDH*, ya que la mayor parte de los casos con pérdida combinada de 1p/19q también eran portadores de la mutación en *IDH* (97,9%), confirmando así los resultados obtenidos por otros autores (106).

El mecanismo que explicaría esta pérdida conjunta de los brazos cromosómicos 1p y 19q se ha descrito que se basa en una translocación centromérica o pericentromérica $t(1;19)(q10;p10)$ tras la cual se produciría la pérdida completa del cromosoma derivado que contiene 1p y 19q (34, 35). La translocación originaría dos cromosomas derivados, uno que contiene los brazos 1p y 19q, y otro que contiene los brazos 1q y 19p. Posteriormente, el cromosoma derivado que contiene los brazos 1p y 19q se perdería en la siguiente división celular, dando lugar a la codeleción conjunta de 1p/19q observada en los tumores oligodendrogiales (35).

En el estudio realizado en este trabajo se seleccionaron una serie de tumores en los que se había detectado dicha pérdida combinada de 1p/19q en un porcentaje relativamente bajo (15-25%) de las células tumorales analizadas. Cabe destacar que los puntos de corte de frecuencia de células con pérdida establecidos para determinar la existencia de codeleción 1p/19q en un tumor se obtienen de manera experimental en cada laboratorio al analizar dicha codeleción en casos no tumorales, y que en nuestro laboratorio se encuentran en torno al 10-15% de las células analizadas. Los resultados obtenidos aquí parecen indicar que en aquellos casos en los que se detecta un porcentaje de pérdida de 1p/19q bajo, no se produce dicha translocación, y por lo tanto, la pérdida de 1p/19q ocurriría por un

mecanismo distinto al descrito previamente y basado en una translocación pericentromérica. Nuestros resultados, sin embargo, confirmaron el mecanismo de pérdida a través de una translocación en la mayoría de los casos en los que se detectó la pérdida combinada de 1p/19q en un porcentaje alto de las células tumorales analizadas (mayor al 40%).

La pérdida de los fragmentos cromosómicos 1p y 19q sugiere la existencia de, al menos, un gen supresor de tumores en 1p y 19q. Sin embargo, parece que el mecanismo que explica esta pérdida conjunta de los brazos cromosómicos 1p y 19q sería una translocación centromérica o pericentromérica no equilibrada $t(1;19)(q10;p10)$ tras la cual se produciría la pérdida del cromosoma derivado que contiene 1p y 19q. La translocación originaría dos cromosomas derivados, uno que contiene los brazos 1p y 19q, y otro que contiene los brazos 1q y 19p. Posteriormente, por mecanismos desconocidos, el cromosoma derivado que contiene los brazos 1p y 19q se perdería en la siguiente división celular. Según los resultados obtenidos aquí, parece que la detección de la translocación no es útil para la identificación temprana de la pérdida combinada de 1p/19q, debido a que no hemos sido capaces de detectar todos los casos que presentaban la codeleción de 1p/19q con estas sondas. Además, la $t(1;19)(q10;p10)$ no se ha identificado en ningún tumor sin codeleción, sugiriendo que son poco frecuentes los casos que presentan la translocación previa a la codeleción de 1p/19q.

En los últimos años, se ha tratado de localizar algún gen de fusión oncogénico en el cromosoma 1 que se viese afectado por la translocación, debido a que el punto de rotura en 1p se mantiene constante, mientras que en 19q parece algo más variable (107, 108). Es el caso del gen *NOTCH2*, que fue valorado como uno de los genes implicados en el desarrollo de los tumores oligodendrogiales (109). Sin embargo, hasta la fecha, la implicación de este gen todavía no se ha confirmado. Por otra parte, la pérdida de los fragmentos cromosómicos 1p y 19q sugiere la existencia de, al menos, un gen supresor de tumores en 1p y 19q. Gracias a estudios de secuenciación masiva, se han podido identificar mutaciones en aquellos oligodendrogliomas con codeleción de 1p/19q que inactivan los genes *CIC* (19q) y *FUBP1* (1p), sugiriendo un papel importante en la patogénesis de los TO (41, 42, 110).

El estudio de la expresión de la proteína ATRX reveló su ausencia mayoritariamente en tumores astrocitarios (alrededor de 45% en As y OA de grados II y III), mientras era infrecuente en OD (7,3%) y en GBMs primarios (1%). Cabe destacar, que la pérdida de expresión de ATRX fue más elevada en tumores de bajo grado que en los de alto grado (68,7% frente 31,3%, respectivamente), sugiriendo también su papel en el inicio de la gliomagénesis. Por tanto, una alteración en la expresión de ATRX podría constituir un nuevo marcador específico para detectar tumores con una diferenciación astrocitaria.

Además, los resultados obtenidos en tumores astrocitarios, confirman que la pérdida de expresión de ATRX, relacionada con la mutación en su secuencia y la consiguiente alteración de su función (111), está implicada en el mecanismo del mantenimiento de los telómeros, produciendo el alargamiento alternativo de los telómeros (ALT) y conduciendo a la inestabilidad cromosómica de estos tumores. En

este contexto, también se han descrito mutaciones en el promotor de *TERT* en GBMs primarios que producen un aumento de la actividad de la telomerasa producida por la sobreexpresión de *TERT* (52). Curiosamente, los casos con mutaciones en *TERT* no presentaban alteraciones en el gen *ATRX*, sugiriendo que el mantenimiento de los telómeros, ya sea a través de la reactivación de la telomerasa por la mutación en el promotor de *TERT* y el aumento de su expresión; o por ALT como resultado de la alteración en *ATRX*, es un paso necesario en la patogénesis de estos tumores (53).

El análisis conjunto de los marcadores analizados indicó que la pérdida de expresión de *ATRX* se encontró fuertemente asociada a la mutación de *IDH* (85,5%), la sobreexpresión de p53 (72,9%) y a ALT (95,5%), mientras que era mutuamente excluyente con la codeleción de 1p/19q, en consonancia con varios estudios recientes (112-114). Por lo tanto, parece que en los gliomas se producen determinadas combinaciones de alteraciones genéticas que determinarían la génesis y evolución tumoral. Mutaciones en *IDH*, como primer evento en el desarrollo tumoral y posteriores alteraciones acumuladas: *ATRX/TP53* en astrocitomas y la pérdida combinada de 1p/19q en oligodendrogliomas.

Biomarcadores con valor pronóstico y/o predictivos de respuesta a tratamiento

La caracterización molecular de los tumores también nos permite identificar marcadores que se asocian a la evolución de la enfermedad, marcadores de pronóstico, así como aquellos predictivos de la respuesta a la terapia. Los de tipo pronóstico nos ayudan a predecir cómo va a evolucionar un paciente según las alteraciones presentes en el tumor, mientras los marcadores predictivos permiten seleccionar aquellos pacientes con mayor probabilidad de respuesta a un determinado tratamiento en función de las alteraciones presentes en el propio tumor. El uso de estos biomarcadores es crucial para acelerar el desarrollo y la validación de tratamientos dirigidos.

En este estudio se observa el papel relevante de las mutaciones del gen *IDH* como marcador pronóstico, mostrando una mayor supervivencia los pacientes con tumores *IDH* mutado frente a aquellos con *IDH* wt (15 y 1,5 años, respectivamente), independientemente del grado tumoral o el subtipo histológico, confirmando así lo descrito previamente (115, 116). Además, el hecho de que estas mutaciones se den en pacientes jóvenes (edad media 41,5 años) sugiere que la mutación de *IDH* podría ayudar a mejorar la supervivencia de estos pacientes. Por otra parte, también se ha sugerido el valor predictivo de respuesta a temozolamida de la mutación de *IDH* en gliomas de bajo grado (117), pero estos resultados necesitan confirmarse en estudios prospectivos. Actualmente, se analiza el posible valor predictivo de esta mutación en dos ensayos clínicos fase III realizados en gliomas de bajo grado, uno del grupo RTOG donde tratan a los pacientes con RT sola o RT junto con PCV, y otro EORT/NCIC (RT frente TMZ). Sin embargo, aunque su valor predictivo todavía no está claro, parece que la proteína mutante *IDH* sería una buena diana para llevar a cabo una terapia selectiva y predecir la eficacia de inhibidores dirigidos a esta mutación.

Así mismo, la supervivencia media de los pacientes con codeleción de 1p/19q fue de 13,5 años, mientras la de aquellos que no presentaban esta alteración molecular fue de 7,5 años, demostrando así su papel pronóstico independiente de la edad, subtipo histológico o el grado tumoral, previamente descrito en tumores oligodendrogiales (12, 13). Recientemente, los datos de dos ensayos clínicos en fase III (EORTC-26951 y RTOG-9402) han demostrado el beneficio de añadir un tratamiento quimioterápico (PCV) a la RT, frente a RT sola, en tumores oligodendrogiales anaplásicos con pérdida combinada de 1p/19q, mientras en aquellos que no presentaban la pérdida no se detectaba un aumento de la supervivencia tras ser tratados con RT y PCV (39, 118). A pesar de estos resultados, sería interesante tener en cuenta el hecho de que hay tumores que no presentan la codeleción de 1p/19q que sí tienen mutado el gen *IDH*, pudiendo utilizar este último para predecir la respuesta al tratamiento de los tumores sin codeleción. En la actualidad, se están realizando ensayos clínicos que utilizan diferentes estrategias para el tratamiento de los pacientes en función del estado de la pérdida de 1p/19q, el estudio CODEL para los que presentan la codeleción y el CATNON para los que no la tienen.

En el presente trabajo se ha detectado también el valor pronóstico de la proteína ATRX dentro de los pacientes con tumores de componente astrocitario (OA y As grados de la OMS II-III) y sin codeleción de 1p/19q, donde aquellos que tenían pérdida de expresión proteica de ATRX vivían más que aquellos que expresaban la proteína (9,3 años frente a 3,9 años). En este conjunto de pacientes, la expresión de p53 también tuvo un valor pronóstico significativo, mostrando una mayor supervivencia los casos de expresión positiva para p53 (93,5 vs 47,2 meses). Recientemente, (112, 113) han demostrado también el valor pronóstico de ATRX en gliomas.

Clasificación molecular de los gliomas

Los distintos estudios de Genética Molecular realizados en gliomas, tanto los ya publicados, como los presentados en este trabajo, han demostrado la importancia de cada una de las alteraciones moleculares identificadas (*IDH*, ATRX, p53 y la codeleción de 1p/19q). Sin embargo, las distintas combinaciones de estas alteraciones genéticas en función de su importancia en la patogénesis y evolución tumoral podrían facilitar el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de los pacientes con gliomas.

De acuerdo al análisis de la mutación de *IDH*, la codeleción de 1p/19q y a la expresión de ATRX se han definido aquí por primera vez cuatro subtipos moleculares distintos dentro de los gliomas, de los cuales tres tenían la mutación en *IDH* (tumores "I-CD", "I-A" y "I"). Además, se observó la asociación entre estas firmas moleculares y la evolución clínica de los pacientes con gliomas. Los tumores "I-CD" (*IDH* mutado y 1p/19q codelecionado) tuvieron un mejor pronóstico (supervivencia global, SG, de 179,5 meses; 15 años) que los "tumores IA" (*IDH*, ATRX y p53 alterados), que presentaban un pronóstico intermedio (SG de 117 meses; 10 años), y que los tumores "I" (sólo *IDH* alterado) con peor pronóstico.

Por lo tanto, estos resultados sugieren que la falta de expresión de la proteína ATRX podría desempeñar un papel importante en la evolución clínica de los tumores astrocitarios, y a su vez, demuestran la importancia de la evaluación de la pérdida combinada de 1p/19q y de la proteína ATRX en tumores con *IDH* mutado para definir distintos grupos de pacientes según su pronóstico.

En este estudio se define un nuevo grupo de tumores (tumores "I") caracterizado por la presencia de mutación en el gen *IDH* pero ausencia de alteraciones en ATRX o en 1p/19q. Los pacientes con este tipo de tumores presentan un comportamiento clínico diferente, a pesar de que el tumor presente mutación de *IDH*, sea de bajo grado (75%) o los pacientes sean más jóvenes (edad media 40,8 años). El pronóstico de estos pacientes es significativamente peor (82,7 meses; 7 años) al de los pertenecientes a los grupos moleculares mencionados anteriormente ("I-CD", "I-A"). Por último, el grupo molecular con peor pronóstico "SA" (10,63 meses) no presentó ninguna de las alteraciones utilizadas para llevar a cabo esta clasificación (*IDH* wt, 1p/19q intacto, expresión de ATRX). En este grupo, a pesar de que estaba compuesto en su mayoría por GBM primarios, también se encontraban tumores de bajo grado (8 casos) o con un componente oligodendroglioma (n=14). De los 8 pacientes con tumores difusos de grado II, 5 habían fallecido en el momento del estudio, presentando una supervivencia global media de 24 meses, inferior a lo esperado en un tumor de grado II.

Los resultados obtenidos, por tanto, muestran la necesidad de incorporar estos marcadores moleculares para la clasificación y la evaluación del pronóstico de los pacientes con gliomas. Dos estudios anteriores han propuesto distintas clasificaciones (77, 113). Un primer estudio realizado por Jiao y colaboradores clasificó las muestras en tres grupos moleculares de gliomas según el estado mutacional de *IDH*, *ATRX*, *CIC* y *FUBP1*: Grupo "I-CF" (similar a la I-CD en este estudio), el grupo "IA" y el grupo "IX", este último grupo incluyendo tanto casos con *IDH* mutado o wild-type y tumores con expresión de ATRX. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que las muestras genéticamente heterogéneas clasificadas por estos autores dentro del mismo grupo molecular ("IX") tienen diferentes pronósticos. La segunda clasificación molecular, sugerida por Wiestler y colaboradores al analizar gliomas anaplásicos, resultó ser ambigua, debido a que su clasificación agrupa astrocitomas anaplásicos con o sin pérdida de la expresión de ATRX, junto con oligoastrocitomas anaplásicos con ausencia de ATRX. En nuestro trabajo hemos demostrado que los AA con pérdida de expresión de la proteína ATRX (grupo "I-A" según nuestra clasificación) muestra mejor SG que aquellos sin esta alteración (grupo "I").

Por lo tanto, hemos identificado por primera vez cuatro grupos de gliomas según sus características moleculares que presentan diferentes pronósticos e histopatologías. Estos resultados sugieren que los gliomas podrían clasificarse de manera más objetiva combinando las características histológicas con las alteraciones moleculares que presenten. De esta manera podrían estratificarse los pacientes para proporcionarles terapias más adecuadas y personalizadas en un futuro.

El algoritmo que se propone de acuerdo al estado mutacional de *IDH*, la codeleción de 1p/19q y la expresión de la proteína ATRX para facilitar el diagnóstico y establecer el pronóstico de pacientes con gliomas se muestra en la siguiente figura (Figura 73).

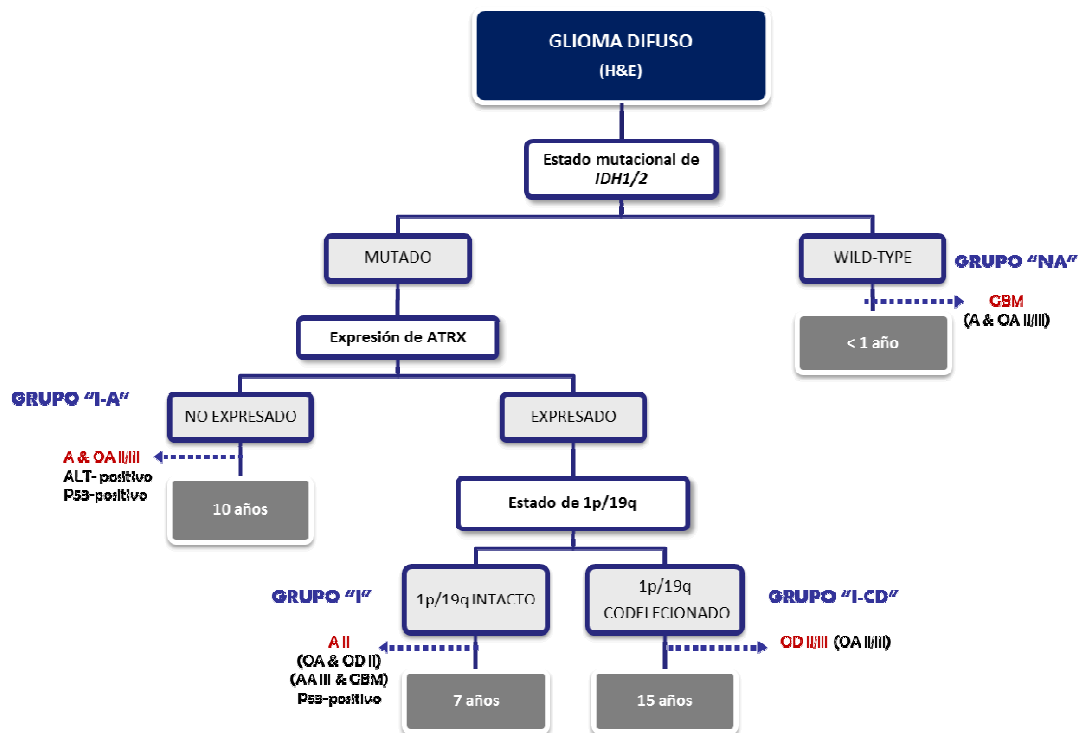


Figura 73. Algoritmo para la clasificación molecular de los pacientes con gliomas.

Perfiles de metilación en tumores oligodendrogiales

La metilación del ADN es la modificación epigenética mejor caracterizada, y se ha identificado como un importante mecanismo de regulación del genoma, habiéndose implicado en el desarrollo embrionario, la transcripción, la estabilidad cromosómica, y la inactivación del cromosoma X, entre otros (119). Además, en cáncer a menudo se produce la metilación en las regiones promotoras de los genes supresores de tumores (120, 121), produciendo la inactivación de su expresión génica y contribuyendo así a la formación de tumores como el segundo "evento" (hit) necesario para que se pierda la función de los genes supresores de tumores (122).

Hasta la fecha no existe un gran número de estudios sobre los perfiles globales de metilación en gliomas, y mucho menos en tumores oligodendrogiales. Los primeros estudios del perfil global de metilación en GBMs (82) identificaron un fenotipo hipermetilador (CpG Island Methylator Phenotype, G-CIMP+) que permitía subdividir las muestras en dos grupos de acuerdo al estado de metilación global del genoma (G-CIMP+ y G-CIMP-). Cabe destacar que el estado CIMP se detectó por primera vez en

cáncer colorectal (123) y en estos tumores se asocia a una elevada frecuencia de mutaciones en los genes *BRAF* y/o *KRAS*, así como a la inestabilidad de microsatélites (MSI) (86, 124). En gliomas, el perfil hipermetilador se ha visto fuertemente asociado a la mutación de los genes *IDH1* e *IDH2*. Una mutación en uno de estos genes conlleva un incremento de 2-hidroxiglutarato, que produce la inhibición de la enzima TET2 hidroxilasa e impide la demetilación de las histonas bloqueando así la diferenciación celular (28, 29). Esta es la causa de que se observe en los gliomas un patrón global de hipermetilación aberrante CIMP+, que estaría acompañado por cambios en la compactación de la cromatina y silenciamiento génico (30). A su vez, se ha descrito que los pacientes con tumores G-CIMP+ presentan una mayor supervivencia, demostrando la importancia de los perfiles de metilación en los tumores cerebrales (82, 84, 85). Por el contrario, en otros tipos de tumores como la leucemia linfoblástica aguda o el cáncer colorectal, el fenotipo hipermetilador se correlaciona con un peor pronóstico (125, 126). Por lo tanto, el impacto clínico del perfil CIMP+ es diferente en función del tipo tumoral.

En este trabajo se detectó que únicamente el 10% de los sitios CpG de todo el genoma estaba alterado en muestras tumorales de oligodendrogliomas al compararlo con muestras de cerebro no tumoral, y que la mayor parte de estas diferencias se debían a una hipermetilación en el tejido tumoral. Así mismo, el estudio de la distribución de las sondas diferencialmente metiladas mostró un incremento de la localización de estas sondas en islas CpG y dentro del cuerpo de los genes, y no únicamente en las regiones promotoras. Esto lleva a pensar que la metilación en el cuerpo del gen puede también provocar el silenciamiento de genes activos. Por otra parte, también se detectó hipometilación en regiones intergénicas en los tumores, regiones compuestas por elementos repetitivos (transposones) y que podrían constituir genes precursores para la síntesis de microARN y provocar una inestabilidad cromosómica. Este resultado está de acuerdo con la hipometilación de las secuencias repetitivas descrita en cáncer (127).

El análisis de metilación identificó genes candidatos asociados al fenotipo G-CIMP+ de los tumores *IDH* mutados. Se detectaron genes con el promotor metilado que habían sido relacionados anteriormente con un perfil de expresión proneural tales como *GDNF*, *SHOX2*, *PRDX1* o *KIAA0495*, entre otros (49, 82). Los genes *SHOX2* y *GDNF* están involucrados en el desarrollo del sistema nervioso y la diferenciación neuronal, y la metilación de estos genes podría resultar en una neurogénesis aberrante. Además, la metilación de los genes *KIAA0495* y *PRDX1* puede inducir resistencia (*KIAA0495*) o sensibilidad (*PRDX1*) a la quimioterapia en células de glioma (101, 128). Sin embargo, a pesar de presentar un perfil hipermetilador asociado a la mutación en *IDH*, en los tumores G-CIMP+ también se detectó la pérdida de metilación dentro del cuerpo de algunos genes (*SMOC1* y *DLL3*) que se correlacionó con la sobreexpresión de los mismos. La sobreexpresión de la proteína SMOC1 (SPARC-related modular calcium-binding protein 1) se había descrito previamente en gliomas (48, 129) sugiriendo que podría ser un nuevo candidato para proporcionar una terapia específica. El gen *DLL3* se identificó también en la firma proneural de GBMs secundarios (49); el producto de este gen inhibe la

neurogénesis primaria, pudiendo ser necesario para desviar las neuronas a lo largo de una ruta de diferenciación específica (130). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Brennan y colaboradores (2013) que encontraron alteraciones específicas dentro del subtipo proneural para aquellos tumores con un perfil G-CIMP+ (53).

Por otra parte, el análisis supervisado entre tumores con la codeleción de 1p/19q y los intactos, identificó que los tumores previamente descritos como G-CIMP+ podían dividirse en dos grupos, a pesar de que en los dos subgrupos de tumores se detectara la mutación de *IDH*. Uno de estos subgrupos presentó la codeleción de 1p/19q (CD-CIMP+, codeleción y perfil hipermetilador), mientras que el otro no la presentaba (CIMP+, sin codeleción pero con perfil hipermetilador). Las diferencias de metilación entre los grupos CD-CIMP+ y CIMP+ fueron evidentes, tanto por los niveles de metilación, como por la distribución de la misma.

En este trabajo pudieron identificarse 4.397 sitios CpG con metilación significativamente diferente entre ambos grupos de tumores (con y sin codeleción de 1p/19q). Algunos de estos genes en los que las islas CpG localizadas en el promotor se encontraban metiladas en tumores CD-CIMP+ fueron: *LDHA*, *CTS2*, *PTRF*, *FGFR2* y *BVES*. Estos genes fueron detectados en otros tipos tumorales, como en cáncer de pulmón, mama, gástrico o en tumores de células germinales (131-135). En gliomas, un estudio reciente mostró el silenciamiento del gen *LDHA* en tumores con *IDH* mutado. Este gen está implicado en la glicólisis y se encuentra regulado por factores inductores de hipoxia (HIF- α), sugiriendo que la inactivación de *LDHA* limita la capacidad glicolítica de estos tumores y que esto podría explicar la progresión más lenta y el mejor pronóstico de los gliomas con *IDH* mutado (136). Otro gen interesante fue *PTRF* (*Polymerase I and Transcript Release Factor*), que juega un papel importante en la formación y organización de caveolas, y se ha identificado como un importante modulador de la quimioresistencia en líneas celulares de GBM (137). Además, se detectó su sobreexpresión en pacientes con gliomas de alto grado (III/IV), mientras que los tumores de grado II presentaban niveles de expresión más bajos, por lo que se sugieren que podría utilizarse como diana para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en pacientes con GBM (137). Curiosamente, en el presente trabajo, *PTRF* se encontró metilado en tumores CD-CIMP+ respecto a los CIMP+. Por lo tanto, los resultados obtenidos y los publicados recientemente indican que sería interesante profundizar en el estudio de este gen en gliomas.

Basándonos en la firma de 4.397 sondas, que permitió identificar tres grupos de tumores con perfiles de metilación diferentes, y mediante datos públicos en los que se utilizó la misma plataforma, se ha podido validar la existencia de estos tres grupos CIMP en dos series independientes de gliomas. En primer lugar, los análisis de la serie analizada aquí se combinaron con la serie de glioblastomas (GBM) del TCGA, detectando que los tumores identificados como G-CIMP+ por el TCGA correspondían a nuestro perfil CIMP+. Esto sugería que estos tumores eran *IDH* mutados y que no presentaban la pérdida combinada en 1p/19q, lo que era esperable, ya que se trataba de GBMs secundarios. Los análisis realizados de la serie publicada por Turcan y colaboradores, que incluía gliomas de alto y bajo

grado, confirmaron que el perfil CIMP+ se encontraba mayoritariamente en gliomas con un componente astrocitario, de acuerdo con los datos obtenidos en este trabajo, mientras que los tumores CD-CIMP+ correspondían principalmente a oligodendrogliomas puros.

El fenotipo hipermetilador CD-CIMP+ se asoció con un pronóstico favorable y se identificó principalmente en oligodendrogliomas puros (88% de los casos). Además, estos tumores CD-CIMP+ mostraron un patrón de expresión génica exclusivo, detectando un conjunto de genes regulados negativamente y localizados en su mayoría en los brazos cromosómicos 1p/19q tales como *FBXO42* y *PTPRF* (situados en 1p36 y 1p34, respectivamente). Estos datos, junto con la pérdida de metilación en estas regiones, sugieren que este patrón de expresión está causado principalmente por el efecto de la dosis génica debida de la pérdida cromosómica en 1p/19q o, alternativamente, a otros mecanismos todavía indeterminados que también participan en la regulación de la expresión génica. Por el contrario, sólo se encontraron unos pocos genes exclusivamente sobreexpresados en estos tumores CD-CIMP+ comparados con los CIMP+ ó CIMP-, entre ellos el gen *DRAM1* (*DNA-damage regulated autophagy modulator 1*), un target directo de *TP53* que juega un papel en el control de la autofagia (138). La sobreexpresión de *DRAM1* podría indicar una respuesta celular diferente para el tratamiento de pacientes con tumores CD-CIMP+.

Por otro lado, el perfil CIMP+ fue encontrado en pacientes de pronóstico intermedio entre tumores CD-CIMP+ y CIMP-, se produjo en tumores mixtos (71%) con mutación en el gen *TP53* (57,1%), pérdida de expresión de la proteína *ATRX* (100%) y sin codeleción de 1p/19q (100%). El perfil de expresión génica en este grupo se caracterizó por una firma mixta entre los tumores CD-CIMP+ y CIMP-, donde una parte del conjunto de genes se debía a la mutación en *IDH* y la otra a no presentar la codeleción de 1p/19q. Sin embargo, también se identificó un patrón de expresión génica específico para estos casos, que se compuso de unos pocos genes, entre los que se encontraba la pérdida de expresión de *TRIP4* (*Thyroid hormone receptor interactor 4*), un coactivador de la transcripción de factores nucleares, en el que también se detectó la metilación en el promotor en este grupo de tumores.

Por último, los tumores CIMP- (o G-CIMP-) se asociaron con un peor pronóstico, probablemente debido a la ausencia de mutación en el gen *IDH* y a no presentar la pérdida de 1p/19q, comportándose clínicamente como GBM. En este último subgrupo, aunque estuvieron representadas ambas histopatologías (OD y OA), también se identificó una firma transcriptómica específica, donde se detectaron niveles más altos de expresión en los genes *PDGFA* y *ENC1*, entre otros. Anteriormente, se había relacionado la sobreexpresión del gen *PDGFA* con un perfil de origen mesenquimal en GBMs (49). La baja expresión génica en *ENC1* en los grupos CD-CIMP+ y CIMP+ se correlacionó con la metilación aberrante de su promotor. Esta firma particular podría ser debida a alteraciones moleculares todavía no identificadas, diferentes a la pérdida de 1p/19q o a las alteraciones en los genes *IDH*, *TP53* o *ATRX*, como han sugerido también otros autores (139).

Es interesante destacar que la correlación negativa entre la metilación en las islas de las regiones promotoras de los genes y su expresión génica fue menor a la esperada, lo cual también se ha observado en un estudio de metilación en leucemia linfocítica crónica (140). Este hecho podría indicar que en ocasiones la metilación por sí sola no es suficiente para alterar la expresión génica, siendo necesarios otros mecanismos de regulación, como son las modificaciones de las histonas, la remodelación de la cromatina, los microRNAs o las mutaciones.

Por lo tanto, el hallazgo más importante obtenido es que el fenotipo G-CIMP+, previamente descrito, comprende en realidad dos perfiles CIMP distintos que pueden ser de relevancia clínica. Se identifican dos nuevos patrones de metilación, ambos asociados a la mutación de *IDH* pero con características moleculares, histopatológicas y pronósticas distintas (Figura 74). Los resultados obtenidos aquí sugieren que el mecanismo del G-CIMP es más complejo de lo que se pensaba, y aunque la mutación en el gen *IDH* se produce de forma temprana y da lugar a patrones de metilación globales en los gliomas, puede que no sea el único causante de este fenotipo, o que el metiloma pueda ser modulado por otras alteraciones genéticas posteriores tales como la codeleción de 1p/19q y/o la mutación del gen *P53* o de *ATRX*. Por otro lado, las diferencias en la supervivencia global observada entre los tres grupos CIMP y las alteraciones moleculares asociadas a cada uno de ellos, sugieren que la inclusión de las distintas variables moleculares en los criterios de la OMS podría facilitar una clasificación más objetiva de los tumores oligodendrogiales. Por otra parte, el análisis de los perfiles de expresión específicos en estos tres grupos CIMP podría identificar biomarcadores candidatos que pueden convertirse en dianas terapéuticas selectivas.

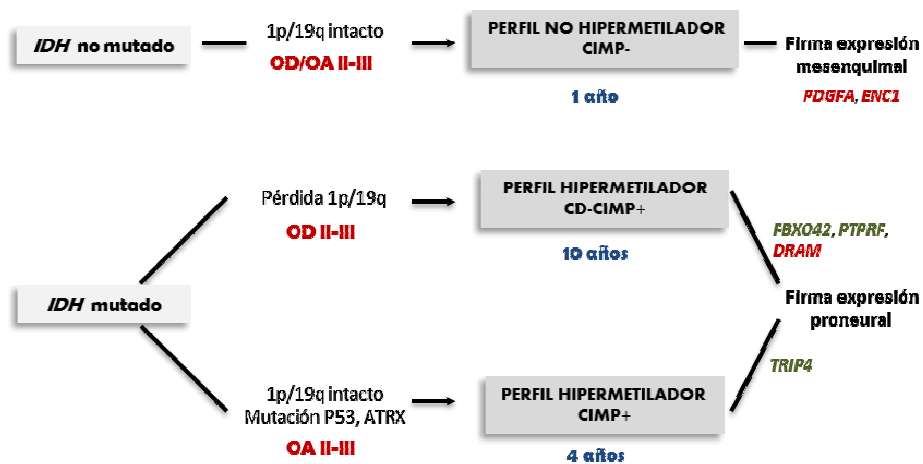


Figura 74. Patrones de metilación identificados en TO asociados con características moleculares, histopatológicas, clínicas y transcriptómicas (rojo, sobreexpresión; verde, represión).

Papel de la metilación del gen *MGMT* en gliomas

Se ha descrito que la metilación de la región promotora del gen *MGMT* provocaría el silenciamiento del mismo al inhibirse su expresión, y por tanto, no se produciría la proteína reparadora (70). De este modo, la efectividad del tratamiento en células tumorales con el promotor *MGMT* metilado sería mayor, ya que perderían su capacidad para retirar los grupos alquilo introducidos por el tratamiento y las células entrarían en apoptosis.

Varios ensayos clínicos y estudios retrospectivos han estudiado la importancia clínica de la metilación del promotor de *MGMT*. En pacientes con GBM, el beneficio de la terapia con fármacos alquilantes en casos metilados se ha descrito en diversos estudios y ensayos clínicos (71, 141), y fue especialmente útil en pacientes con GBM de avanzada edad (75-78, 142, 143), lo que indicaba un valor predictivo del estado de metilación del promotor de *MGMT*. Sin embargo, el valor pronóstico de la metilación de *MGMT*, no el predictivo, se detectó en pacientes con gliomas anaplásicos que recibían RT, quimioterapia, o ambos tratamientos (14, 81).

El análisis detallado de la metilación en el gen *MGMT* usando la plataforma HM-450K en una serie de 247 gliomas (incluyendo TO y As de grado II/III/IV) mostró dos regiones fuertemente asociadas con supervivencia, una situada dentro del promotor (CpG 25), y otra dentro del cuerpo del gen *MGMT* (CpG 165). Estos resultados apoyan la evidencia previa de que existe una relación entre la distribución de la metilación de los sitios CpG de *MGMT* y su valor pronóstico (144). Bady y colaboradores identificaron dos CpGs muy correlacionadas con supervivencia, entre las que se encuentran la CpG 25, y la CpG 19, ambas situadas dentro del promotor e identificadas como clínicamente relevantes también en este estudio. Además, un estudio reciente realizado en la serie del EORTC-26951 por Van de Bent y colaboradores, reveló uno de estos sitios CpG (CpG 25) como la CpG diferencialmente metilada asociada con mayor supervivencia en pacientes con tumores oligodendrogiales anaplásicos (97).

Las técnicas más ampliamente utilizadas para detectar la metilación del promotor de *MGMT* actualmente son la MSP, qMSP y pirosecuenciación (70, 71, 96, 98, 145), destacando que la CpG 25 está incluida en el primer reverso utilizado para MSP y qMSP, y que se encuentra dentro de la región analizada por pirosecuenciación. Sin embargo, la CpG 165, se ha identificado por primera vez como clínicamente importante en este trabajo y todavía no hay técnicas que se empleen en la práctica clínica para detectar su metilación.

El estudio del estado del perfil de metilación global (G-CIMP) junto con el análisis detallado de la metilación en el gen completo de *MGMT* nos permitió demostrar que la mayoría de los gliomas con un perfil hipermetilador G-CIMP+ se encontraban también metilados en ambas regiones de *MGMT* asociadas con supervivencia (CpG 25 y CpG 165). Esta fuerte correlación sugiere que la mutación en el gen *IDH*, que provoca el patrón de metilación aberrante en todo el genoma (G-CIMP+), conduce a la metilación específica del gen *MGMT*, no sólo dentro de su región promotora, sino también en otras

regiones del gen, como se ha detectado en la CpG 165 situada en el cuerpo del gen. Además, con estos resultados se podría especular que el patrón de metilación global causado por la mutación de *IDH* no se da al azar, sino que se produce de forma dirigida a regiones específicas del genoma. Por otro lado, recientemente, la importancia clínica de la metilación del promotor de *MGMT* podría ser cuestionada por la importancia del estado G-CIMP como factor independiente de pronóstico, como han mostrado los resultados obtenidos y como han sugerido otros autores (30, 85, 146).

El análisis de la metilación del gen *MGMT* teniendo en cuenta únicamente aquellos pacientes con un perfil G-CIMP- (*IDH* wt), mostró que alrededor del 50% tenía el gen *MGMT* metilado, en consonancia con los resultados de otros estudios (82, 85, 144, 147). Sin embargo ninguno de ellos ha estudiado la relevancia clínica de la metilación de *MGMT* exclusivamente en este grupo G-CIMP-. Nuestros resultados indican que la metilación del promotor de *MGMT* determinada por HM-450K (CpG 25), no tiene valor pronóstico en estos tumores con perfil G-CIMP- (siendo mayoritariamente casos con GBM o gliomas de alto grado), de acuerdo con los resultados obtenidos en el trabajo de Wick y colaboradores donde, el hecho de tener el promotor *MGMT* metilado aportaba una mayor supervivencia únicamente en pacientes con tumores con *IDH* mutado (G-CIMP+) (143). En una serie adicional de GBM primarios con ausencia de mutación *IDH* (G-CIMP-) reportados por Mulholland et al, 2012 (98), también se detectó esta falta de significado pronóstico para la CpG 25 de la región promotora de *MGMT*, en este caso analizada por pirosecuenciación. Además, este resultado también se ha validado en una serie independiente de TO anaplásicos correspondiente al ensayo clínico EORTC-26951 (97), en el que utilizan HM-450K y HM-27K para el análisis de la metilación del gen *MGMT*.

Por otra parte, el estudio del posible papel pronóstico de otras regiones adicionales del gen *MGMT* en tumores G-CIMP-, mostró que los pacientes mayores de 65 años con tumores metilados en el cuerpo de *MGMT* (CpG 165) vivían más que los que no tenían esta metilación (13 meses vs. 7 meses, respectivamente). Muy recientemente, los análisis de la metilación en el cuerpo del gen *MGMT* han identificado un papel funcional de la modificación de citosinas situadas en el cuerpo en la regulación de la expresión génica, así como la sensibilidad a TMZ en líneas celulares de GBM con el promotor no metilado (148). Por lo tanto, serían necesarios más análisis sobre el impacto de la metilación de *MGMT* (tanto en el promotor como en el cuerpo del gen) en la expresión de la proteína para establecer más adelante posibles ajustes en el tratamiento de pacientes mayores. Sin embargo, habría que tener en cuenta que los niveles de proteína *MGMT* no tienen una significación clínica evidente y no existe una correlación negativa clara entre la metilación y la alteración de su expresión génica (149, 150).

Teniendo en cuenta el valor predictivo de respuesta a TMZ de la metilación del promotor de *MGMT* observado en ensayos clínicos de pacientes con GBM (8, 71) y en pacientes con GBM de avanzada edad (77, 78, 143) se seleccionó un conjunto de pacientes con GBM tratados homogéneamente con RT y TMZ concomitante y se analizó la metilación del promotor del gen *MGMT* mediante los ensayos MSP y qMSP. Interesantemente, los estudios de supervivencia realizados aquí en función del estado de metilación de

MGMT no mostraron una mayor supervivencia en aquellos casos con el promotor metilado, siendo contradictorios a los resultados extraídos de estos ensayos clínicos. Los resultados contradictorios obtenidos en este estudio podrían explicarse, en parte, debido a que la serie es pequeña, siendo necesario ampliar la serie para llevar a cabo un estudio más robusto. Otra posible explicación podría ser que los ensayos de MSP y qMSP no pueden detectar la metilación heterogénea en la región promotora, especialmente, como sugiere Mulholland (98), cuando los tumores muestran niveles bajos de metilación en cualquiera de los cebadores, provocando variabilidad en los resultados. Sin embargo, también hay que destacar que en los ensayos clínicos, en los que se demuestra el valor predictivo de la metilación del promotor de *MGMT*, únicamente pudieron determinar el estado de metilación en el 40-50% de los casos, siendo una limitación de estos estudios para la obtención de resultados más concluyentes.

Desafortunadamente, las dificultades técnicas para el estudio de metilación de *MGMT*, junto con las distintas CpG analizadas y la calidad variable del material de partida (80), así como la heterogeneidad observada en la distribución de la metilación dentro del gen *MGMT*, y la necesidad de determinar los valores de corte clínicamente relevantes en cada centro, hacen que los resultados que se obtienen sean poco robustos como para incluir en la práctica clínica el análisis del estado de metilación de *MGMT* y que sean necesarios más estudios.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Se ha confirmado el valor diagnóstico y pronóstico de la mutación en el gen *IDH1* y la codeleción de los brazos cromosómicos 1p y 19q.
2. La expresión de la proteína ATRX constituye un nuevo marcador de utilidad en el diagnóstico de los gliomas de adultos, así como para establecer el pronóstico en pacientes con tumores astrocitarios.
3. Se ha confirmado que la alteración en *ATRX* está implicada en el mecanismo de mantenimiento de los telómeros (ALT).
4. La combinación de la mutación de *IDH*, la codeleción de 1p/19q y la expresión de ATRX han permitido la identificación de cuatro grupos de pacientes con distinto pronóstico clínico.
5. El estudio de la translocación no parece ser útil para la identificación temprana de la pérdida combinada de 1p/19q. Probablemente la translocación no sea el único mecanismo que provoca la pérdida combinada de 1p y 19q.
6. El análisis de la metilación global del genoma en oligodendrogliomas ha permitido identificar tres grupos de tumores en función de los perfiles de metilación que presentan. Estos patrones de metilación están caracterizados por diferentes histopatologías, características moleculares y clínicas y firmas de expresión génica específicas.
7. Los distintos perfiles de metilación podrían contribuir a la clasificación molecular de los gliomas y a una estratificación de los pacientes para una terapia personalizada.
8. Se han identificado dos sitios CpG dentro del gen *MGMT* relacionados con supervivencia, uno correspondiente a la región promotora (CpG 25) y otro al cuerpo de *MGMT* (CpG 165).
9. En la determinación del valor pronóstico de la metilación del gen *MGMT* debe tenerse en cuenta el estado mutacional de *IDH* y la edad. Se ha demostrado el valor pronóstico del gen *MGMT* (promotor y cuerpo) en gliomas con perfiles G-CIMP+ con mutación en el gen *IDH1*.
10. En pacientes con tumores G-CIMP- (*IDH* wt), únicamente se ha detectado el impacto pronóstico de la CpG 165 localizada en el cuerpo del gen de *MGMT* en pacientes mayores de 65 años.
11. La metilación heterogénea observada a lo largo del gen *MGMT* debe ser considerada como un punto importante para la selección de las técnicas y regiones más adecuadas para el análisis rutinario del estado de metilación de *MGMT*.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

1. Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro Oncol* 2012;14 Suppl 5:v1-49.
2. Vilar González SyGG, M. *Protocolo de los Tumores de Sistema Nervioso.* . Barcelona: Publicaciones Permanyer ed. 2008.
3. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, *et al.* The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007;114:97-109.
4. Burger P. *Tumors of the Central Nervous System. AFIP Atlas of Tumor Pathology. Vol 4.* 2007.
5. Prayson R. *Neuropathology. Foundations in Diagnostic Pathology.* In: Elsevier Churchill Livingstone edn, 2005.
6. Ironside JW LD, Lowe JS, Weller RO. *Diagnostic Pathology of Nervous System Tumours.* In: 2002.
7. Brem SS, Bierman PJ, Brem H, *et al.* Central nervous system cancers. *J Natl Compr Canc Netw* 2011;9:352-400.
8. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, *et al.* Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;352:987-96.
9. Raymond E, Izbicka E, Soda H, *et al.* Activity of temozolomide against human tumor colony-forming units. *Clin Cancer Res* 1997;3:1769-74.
10. Wesolowski JR, Rajdev P, Mukherji SK. Temozolomide (Temodar). *AJNR Am J Neuroradiol* 2010;31:1383-4.
11. Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE, *et al.* Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol* 2007;25:4722-9.
12. Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, *et al.* Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1473-9.
13. van den Bent MJ, Carpentier AF, Brandes AA, *et al.* Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine improves progression-free survival but not overall survival in newly diagnosed anaplastic oligodendrogliomas and oligoastrocytomas: a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer phase III trial. *J Clin Oncol* 2006;24:2715-22.
14. Wick W, Hartmann C, Engel C, *et al.* NOA-04 randomized phase III trial of sequential radiochemotherapy of anaplastic glioma with procarbazine, lomustine, and vincristine or temozolomide. *J Clin Oncol* 2009;27:5874-80.
15. Winger MJ, Macdonald DR, Cairncross JG. Supratentorial anaplastic gliomas in adults. The prognostic importance of extent of resection and prior low-grade glioma. *J Neurosurg* 1989;71:487-93.
16. M. L. A multivariate analysis of 415 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection and survival. In: 2010.

17. Walker MD, Green SB, Byar DP, *et al.* Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery. *N Engl J Med* 1980;303:1323-9.
18. Westphal M, Ram Z, Riddle V, *et al.* Gliadel wafer in initial surgery for malignant glioma: long-term follow-up of a multicenter controlled trial. *Acta Neurochir (Wien)* 2006;148:269-75; discussion 75.
19. Parsons DW, Jones S, Zhang X, *et al.* An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 2008;321:1807-12.
20. Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res* 2013;19:764-72.
21. Dunn GP, Andronesi OC, Cahill DP. From genomics to the clinic: biological and translational insights of mutant IDH1/2 in glioma. *Neurosurg Focus* 2013;34:E2.
22. Jansen M, Yip S, Louis DN. Molecular pathology in adult gliomas: diagnostic, prognostic, and predictive markers. *Lancet Neurol* 2010;9:717-26.
23. Capper D, Weissert S, Balss J, *et al.* Characterization of R132H mutation-specific IDH1 antibody binding in brain tumors. *Brain Pathol* 2010;20:245-54.
24. von Deimling A, Korshunov A, Hartmann C. The next generation of glioma biomarkers: MGMT methylation, BRAF fusions and IDH1 mutations. *Brain Pathol* 2011;21:74-87.
25. Zhao S, Lin Y, Xu W, *et al.* Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1 α . *Science* 2009;324:261-5.
26. Dang L, Jin S, Su SM. IDH mutations in glioma and acute myeloid leukemia. *Trends Mol Med* 2010;16:387-97.
27. Xu W, Yang H, Liu Y, *et al.* Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell* 2011;19:17-30.
28. Lu C, Ward PS, Kapoor GS, *et al.* IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature* 2012;483:474-8.
29. Ward PS, Cross JR, Lu C, *et al.* Identification of additional IDH mutations associated with oncometabolite R(-)-2-hydroxyglutarate production. *Oncogene* 2012;31:2491-8.
30. Turcan S, Rohle D, Goenka A, *et al.* IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature* 2012;483:479-83.
31. Reifenberger J, Reifenberger G, Liu L, *et al.* Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p. *Am J Pathol* 1994;145:1175-90.
32. Bello MJ, Leone PE, Vaquero J, *et al.* Allelic loss at 1p and 19q frequently occurs in association and may represent early oncogenic events in oligodendroglial tumors. *Int J Cancer* 1995;64:207-10.
33. Kraus JA, Koopmann J, Kaskel P, *et al.* Shared allelic losses on chromosomes 1p and 19q suggest a common origin of oligodendroglioma and oligoastrocytoma. *J Neuropathol Exp Neurol* 1995;54:91-5.

34. Griffin CA, Burger P, Morsberger L, *et al.* Identification of der(1;19)(q10;p10) in five oligodendrogliomas suggests mechanism of concurrent 1p and 19q loss. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006;65:988-94.
35. Jenkins RB, Blair H, Ballman KV, *et al.* A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma. *Cancer Res* 2006;66:9852-61.
36. Jeuken JW, von Deimling A, Wesseling P. Molecular pathogenesis of oligodendroglial tumors. *J Neurooncol* 2004;70:161-81.
37. Gupta M, Djalilvand A, Brat DJ. Clarifying the diffuse gliomas: an update on the morphologic features and markers that discriminate oligodendroglioma from astrocytoma. *Am J Clin Pathol* 2005;124:755-68.
38. Smith JS, Perry A, Borell TJ, *et al.* Alterations of chromosome arms 1p and 19q as predictors of survival in oligodendrogliomas, astrocytomas, and mixed oligoastrocytomas. *J Clin Oncol* 2000;18:636-45.
39. Cairncross G, Wang M, Shaw E, *et al.* Phase III trial of chemoradiotherapy for anaplastic oligodendroglioma: long-term results of RTOG 9402. *J Clin Oncol* 2013;31:337-43.
40. Erdem-Eraslan L, Gravendeel LA, de Rooi J, *et al.* Intrinsic molecular subtypes of glioma are prognostic and predict benefit from adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine chemotherapy in combination with other prognostic factors in anaplastic oligodendroglial brain tumors: a report from EORTC study 26951. *J Clin Oncol* 2013;31:328-36.
41. Bettgowda C, Agrawal N, Jiao Y, *et al.* Mutations in CIC and FUBP1 contribute to human oligodendroglioma. *Science* 2011;333:1453-5.
42. Yip S, Butterfield YS, Morozova O, *et al.* Concurrent CIC mutations, IDH mutations, and 1p/19q loss distinguish oligodendrogliomas from other cancers. *J Pathol* 2012;226:7-16.
43. Sahm F, Koelsche C, Meyer J, *et al.* CIC and FUBP1 mutations in oligodendrogliomas, oligoastrocytomas and astrocytomas. *Acta Neuropathol* 2012;123:853-60.
44. Louis DN. Molecular pathology of malignant gliomas. *Annu Rev Pathol* 2006;1:97-117.
45. Van Meir EG, Hadjipanayis CG, Norden AD, *et al.* Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA Cancer J Clin* 2010;60:166-93.
46. Yip S, Iafrate AJ, Louis DN. Molecular diagnostic testing in malignant gliomas: a practical update on predictive markers. *J Neuropathol Exp Neurol* 2008;67:1-15.
47. Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *Am J Pathol* 2009;174:1149-53.
48. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, *et al.* Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* 2006;9:157-73.
49. Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, *et al.* Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 2010;17:98-110.

50. Seguí N, Pineda M, Guinó E, *et al.* Telomere length and genetic anticipation in Lynch syndrome. *PLoS One* 2013;8:e61286.
51. Blasco MA. Telomere length, stem cells and aging. *Nat Chem Biol* 2007;3:640-9.
52. Killela PJ, Reitman ZJ, Jiao Y, *et al.* TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:6021-6.
53. Brennan CW, Verhaak RG, McKenna A, *et al.* The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 2013;155:462-77.
54. Schwartzentruber J, Korshunov A, Liu XY, *et al.* Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature* 2012;482:226-31.
55. Marinoni I, Kurrer AS, Vassella E, *et al.* Loss of DAXX and ATRX are associated with chromosome instability and reduced survival of patients with pancreatic neuroendocrine tumors. *Gastroenterology* 2014;146:453-60.e5.
56. Heaphy CM, de Wilde RF, Jiao Y, *et al.* Altered telomeres in tumors with ATRX and DAXX mutations. *Science* 2011;333:425.
57. Nguyen DN, Heaphy CM, de Wilde RF, *et al.* Molecular and morphologic correlates of the alternative lengthening of telomeres phenotype in high-grade astrocytomas. *Brain Pathol* 2013;23:237-43.
58. Korochkin LI. [What is epigenetics]. *Genetika* 2006;42:1156-64.
59. Berdasco M, Esteller M. Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. *Dev Cell* 2010;19:698-711.
60. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol* 2010;28:1057-68.
61. Cheng X, Blumenthal RM. Mammalian DNA methyltransferases: a structural perspective. *Structure* 2008;16:341-50.
62. Suzuki MM, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet* 2008;9:465-76.
63. Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 2007;8:286-98.
64. Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet* 2005;6:597-610.
65. Baylin SB. DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2005;2 Suppl 1:S4-11.
66. Kreth S, Thon N, Kreth FW. Epigenetics in human gliomas. *Cancer Lett* 2014;342:185-92.
67. Pegg AE, Dolan ME, Moschel RC. Structure, function, and inhibition of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1995;51:167-223.
68. Srivenugopal KS, Yuan XH, Friedman HS, Ali-Osman F. Ubiquitination-dependent proteolysis of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human and murine tumor cells following

- inactivation with O6-benzylguanine or 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Biochemistry* 1996;35:1328-34.
69. Kaina B, Christmann M, Naumann S, Roos WP. MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair (Amst)* 2007;6:1079-99.
 70. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, *et al.* Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 2000;343:1350-4.
 71. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, *et al.* MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;352:997-1003.
 72. Bleeker FE, Molenaar RJ, Leenstra S. Recent advances in the molecular understanding of glioblastoma. *J Neurooncol* 2012;108:11-27.
 73. Weller M, Stupp R, Reifenberger G, *et al.* MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nat Rev Neurol* 2010;6:39-51.
 74. Mellai M, Monzeglio O, Piazzini A, *et al.* MGMT promoter hypermethylation and its associations with genetic alterations in a series of 350 brain tumors. *J Neurooncol* 2012;107:617-31.
 75. Brandes AA, Franceschi E, Tosoni A, *et al.* Temozolomide concomitant and adjuvant to radiotherapy in elderly patients with glioblastoma: correlation with MGMT promoter methylation status. *Cancer* 2009;115:3512-8.
 76. Malmström A, Grønberg BH, Marosi C, *et al.* Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012;13:916-26.
 77. Wiestler B, Claus R, Hartlieb SA, *et al.* Malignant astrocytomas of elderly patients lack favorable molecular markers: an analysis of the NOA-08 study collective. *Neuro Oncol* 2013;15:1017-26.
 78. Reifenberger G, Hentschel B, Felsberg J, *et al.* Predictive impact of MGMT promoter methylation in glioblastoma of the elderly. *Int J Cancer* 2012;131:1342-50.
 79. Wick W, Platten M, Meisner C, *et al.* Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012;13:707-15.
 80. Fietkau R, Putz F, Lahmer G, Semrau S, Buslei R. Can MGMT promoter methylation status be used as a prognostic and predictive marker for glioblastoma multiforme at the present time? A word of caution. *Strahlenther Onkol* 2013;189:993-5.
 81. van den Bent MJ, Dubbink HJ, Sanson M, *et al.* MGMT promoter methylation is prognostic but not predictive for outcome to adjuvant PCV chemotherapy in anaplastic oligodendroglial tumors: a report from EORTC Brain Tumor Group Study 26951. *J Clin Oncol* 2009;27:5881-6.
 82. Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, *et al.* Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell* 2010;17:510-22.
 83. Christensen BC, Smith AA, Zheng S, *et al.* DNA methylation, isocitrate dehydrogenase mutation, and survival in glioma. *J Natl Cancer Inst* 2011;103:143-53.
 84. Laffaire J, Everhard S, Idbaih A, *et al.* Methylation profiling identifies 2 groups of gliomas according to their tumorigenesis. *Neuro Oncol* 2011;13:84-98.

-
85. van den Bent MJ, Gravendeel LA, Gorlia T, *et al.* A hypermethylated phenotype is a better predictor of survival than MGMT methylation in anaplastic oligodendroglial brain tumors: a report from EORTC study 26951. *Clin Cancer Res* 2011;17:7148-55.
 86. Curtin K, Slattery ML, Samowitz WS. CpG island methylation in colorectal cancer: past, present and future. *Patholog Res Int* 2011;2011:902674.
 87. Fraga MF, Esteller M. Towards the human cancer epigenome: a first draft of histone modifications. *Cell Cycle* 2005;4:1377-81.
 88. Sterner DE, Berger SL. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000;64:435-59.
 89. Roth SY, Denu JM, Allis CD. Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* 2001;70:81-120.
 90. Karlič R, Chung HR, Lasserre J, Vlahovicek K, Vingron M. Histone modification levels are predictive for gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:2926-31.
 91. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* 2011;21:381-95.
 92. Wu G, Broniscer A, McEachron TA, *et al.* Somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non-brainstem glioblastomas. *Nat Genet* 2012;44:251-3.
 93. Villuendas R, Piris MA, Algara P, *et al.* The expression of p53 protein in non-Hodgkin's lymphomas is not always dependent on p53 gene mutations. *Blood* 1993;82:3151-6.
 94. Balss J, Meyer J, Mueller W, *et al.* Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol* 2008;116:597-602.
 95. Hartmann C, Meyer J, Balss J, *et al.* Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas. *Acta Neuropathol* 2009;118:469-74.
 96. Ramalho-Carvalho J, Pires M, Lisboa S, *et al.* Altered expression of MGMT in high-grade gliomas results from the combined effect of epigenetic and genetic aberrations. *PLoS One* 2013;8:e58206.
 97. van den Bent MJ, Erdem-Eraslan L, Idbaih A, *et al.* MGMT-STP27 methylation status as predictive marker for response to PCV in anaplastic Oligodendrogliomas and Oligoastrocytomas. A report from EORTC study 26951. *Clin Cancer Res* 2013;19:5513-22.
 98. Mulholland S, Pearson DM, Hamoudi RA, *et al.* MGMT CpG island is invariably methylated in adult astrocytic and oligodendroglial tumors with IDH1 or IDH2 mutations. *Int J Cancer* 2012;131:1104-13.
 99. Wu X, Rauch TA, Zhong X, *et al.* CpG island hypermethylation in human astrocytomas. *Cancer Res* 2010;70:2718-27.
 100. Rahmatpanah FB, Carstens S, Hooshmand SI, *et al.* Large-scale analysis of DNA methylation in chronic lymphocytic leukemia. *Epigenomics* 2009;1:39-61.
 101. Pang JC, Li KK, Lau KM, *et al.* KIAA0495/PDAM is frequently downregulated in oligodendroglial tumors and its knockdown by siRNA induces cisplatin resistance in glioma cells. *Brain Pathol* 2010;20:1021-32.
-

-
102. Gupta R, Flanagan S, Li CC, *et al.* Expanding the spectrum of IDH1 mutations in gliomas. *Mod Pathol* 2013;26:619-25.
 103. van den Bent MJ, Looijenga LH, Langenberg K, *et al.* Chromosomal anomalies in oligodendroglial tumors are correlated with clinical features. *Cancer* 2003;97:1276-84.
 104. Felsberg J, Erkwow A, Sabel MC, *et al.* Oligodendroglial tumors: refinement of candidate regions on chromosome arm 1p and correlation of 1p/19q status with survival. *Brain Pathol* 2004;14:121-30.
 105. Okamoto Y, Di Patre PL, Burkhard C, *et al.* Population-based study on incidence, survival rates, and genetic alterations of low-grade diffuse astrocytomas and oligodendrogliomas. *Acta Neuropathol* 2004;108:49-56.
 106. Labussière M, Idbaih A, Wang XW, *et al.* All the 1p19q codeleted gliomas are mutated on IDH1 or IDH2. *Neurology* 2010;74:1886-90.
 107. Boulay JL, Miserez AR, Zweifel C, *et al.* Loss of NOTCH2 positively predicts survival in subgroups of human glial brain tumors. *PLoS One* 2007;2:e576.
 108. Benetkiewicz M, Idbaih A, Cousin PY, *et al.* NOTCH2 is neither rearranged nor mutated in t(1;19) positive oligodendrogliomas. *PLoS One* 2009;4:e4107.
 109. Vogazianou AP, Chan R, Bäcklund LM, *et al.* Distinct patterns of 1p and 19q alterations identify subtypes of human gliomas that have different prognoses. *Neuro Oncol* 2010;12:664-78.
 110. Koelsche C, Sahm F, Capper D, *et al.* Distribution of TERT promoter mutations in pediatric and adult tumors of the nervous system. *Acta Neuropathol* 2013;126:907-15.
 111. Liu XY, Gerges N, Korshunov A, *et al.* Frequent ATRX mutations and loss of expression in adult diffuse astrocytic tumors carrying IDH1/IDH2 and TP53 mutations. *Acta Neuropathol* 2012;124:615-25.
 112. Wiestler B, Capper D, Holland-Letz T, *et al.* ATRX loss refines the classification of anaplastic gliomas and identifies a subgroup of IDH mutant astrocytic tumors with better prognosis. *Acta Neuropathol* 2013;126:443-51.
 113. Jiao Y, Killela PJ, Reitman ZJ, *et al.* Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas. *Oncotarget* 2012;3:709-22.
 114. Cai J, Yang P, Zhang C, *et al.* ATRX mRNA expression combined with IDH1/2 mutational status and Ki-67 expression refines the molecular classification of astrocytic tumors: evidence from the whole transcriptome sequencing of 169 samples. *Oncotarget* 2014;5:2551-61.
 115. Metellus P, Coulibaly B, Colin C, *et al.* Absence of IDH mutation identifies a novel radiologic and molecular subtype of WHO grade II gliomas with dismal prognosis. *Acta Neuropathol* 2010;120:719-29.
 116. Hartmann C, Hentschel B, Simon M, *et al.* Long-term survival in primary glioblastoma with versus without isocitrate dehydrogenase mutations. *Clin Cancer Res* 2013;19:5146-57.
 117. Houillier C, Wang X, Kaloshi G, *et al.* IDH1 or IDH2 mutations predict longer survival and response to temozolomide in low-grade gliomas. *Neurology* 2010;75:1560-6.

118. van den Bent MJ, Brandes AA, Taphoorn MJ, *et al.* Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine chemotherapy in newly diagnosed anaplastic oligodendroglioma: long-term follow-up of EORTC brain tumor group study 26951. *J Clin Oncol* 2013;31:344-50.
119. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002;16:6-21.
120. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008;358:1148-59.
121. Taby R, Issa JP. Cancer epigenetics. *CA Cancer J Clin* 2010;60:376-92.
122. Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971;68:820-3.
123. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, *et al.* CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:8681-6.
124. Issa JP, Shen L, Toyota M. CIMP, at last. *Gastroenterology* 2005;129:1121-4.
125. Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, *et al.* Lack of CpG island methylator phenotype defines a clinical subtype of T-cell acute lymphoblastic leukemia associated with good prognosis. *J Clin Oncol* 2005;23:7043-9.
126. Bae JM, Kim JH, Cho NY, Kim TY, Kang GH. Prognostic implication of the CpG island methylator phenotype in colorectal cancers depends on tumour location. *Br J Cancer* 2013;109:1004-12.
127. Ehrlich M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* 2002;21:5400-13.
128. Dittmann LM, Danner A, Gronych J, *et al.* Downregulation of PRDX1 by promoter hypermethylation is frequent in 1p/19q-deleted oligodendroglial tumours and increases radio- and chemosensitivity of Hs683 glioma cells in vitro. *Oncogene* 2012;31:3409-18.
129. Brellier F, Ruggiero S, Zwolanek D, *et al.* SMOC1 is a tenascin-C interacting protein over-expressed in brain tumors. *Matrix Biol* 2011;30:225-33.
130. Ladi E, Nichols JT, Ge W, *et al.* The divergent DSL ligand Dll3 does not activate Notch signaling but cell autonomously attenuates signaling induced by other DSL ligands. *J Cell Biol* 2005;170:983-92.
131. Shames DS, Girard L, Gao B, *et al.* A genome-wide screen for promoter methylation in lung cancer identifies novel methylation markers for multiple malignancies. *PLoS Med* 2006;3:e486.
132. Ishikawa J, Taniguchi T, Higashi H, *et al.* High lactate dehydrogenase isoenzyme 1 in a patient with malignant germ cell tumor is attributable to aberrant methylation of the LDHA gene. *Clin Chem* 2004;50:1826-8.
133. Bai L, Deng X, Li Q, *et al.* Down-regulation of the cavin family proteins in breast cancer. *J Cell Biochem* 2012;113:322-8.
134. Kim M, Jang HR, Haam K, *et al.* Frequent silencing of popeye domain-containing genes, BVES and POPDC3, is associated with promoter hypermethylation in gastric cancer. *Carcinogenesis* 2010;31:1685-93.
135. Park S, Kim JH, Jang JH. Aberrant hypermethylation of the FGFR2 gene in human gastric cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;357:1011-5.

136. Chesnelong C, Chaumeil MM, Blough MD, *et al.* Lactate dehydrogenase A silencing in IDH mutant gliomas. *Neuro Oncol* 2014;16:686-95.
137. Wang X, Liu T, Bai Y, *et al.* Polymerase I and transcript release factor acts as an essential modulator of glioblastoma chemoresistance. *PLoS One* 2014;9:e93439.
138. Ryan KM. p53 and autophagy in cancer: guardian of the genome meets guardian of the proteome. *Eur J Cancer* 2011;47:44-50.
139. Kim W, Liau LM. IDH mutations in human glioma. *Neurosurg Clin N Am* 2012;23:471-80.
140. Kulis M, Heath S, Bibikova M, *et al.* Epigenomic analysis detects widespread gene-body DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 2012;44:1236-42.
141. Rivera AL, Pelloski CE, Gilbert MR, *et al.* MGMT promoter methylation is predictive of response to radiotherapy and prognostic in the absence of adjuvant alkylating chemotherapy for glioblastoma. *Neuro Oncol* 2010;12:116-21.
142. Minniti G, Salvati M, Arcella A, *et al.* Correlation between O6-methylguanine-DNA methyltransferase and survival in elderly patients with glioblastoma treated with radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide. *J Neurooncol* 2011;102:311-6.
143. Wick W, Meisner C, Hentschel B, *et al.* Prognostic or predictive value of MGMT promoter methylation in gliomas depends on IDH1 mutation. *Neurology* 2013;81:1515-22.
144. Bady P, Sciuscio D, Diserens AC, *et al.* MGMT methylation analysis of glioblastoma on the Infinium methylation BeadChip identifies two distinct CpG regions associated with gene silencing and outcome, yielding a prediction model for comparisons across datasets, tumor grades, and CIMP-status. *Acta Neuropathol* 2012;124:547-60.
145. Karayan-Tapon L, Quillien V, Guilhot J, *et al.* Prognostic value of O6-methylguanine-DNA methyltransferase status in glioblastoma patients, assessed by five different methods. *J Neurooncol* 2010;97:311-22.
146. Abhinav K, Aquilina K, Gbejuade H, *et al.* A pilot study of glioblastoma multiforme in elderly patients: treatments, O-6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) methylation status and survival. *Clin Neurol Neurosurg* 2013;115:1375-8.
147. Etcheverry A, Aubry M, de TAYRAC M, *et al.* DNA methylation in glioblastoma: impact on gene expression and clinical outcome. *BMC Genomics* 2010;11:701.
148. Moen EL, Stark AL, Zhang W, Dolan ME, Godley LA. The role of gene body cytosine modifications in MGMT expression and sensitivity to temozolomide. *Mol Cancer Ther* 2014.
149. Felsberg J, Rapp M, Loeser S, *et al.* Prognostic significance of molecular markers and extent of resection in primary glioblastoma patients. *Clin Cancer Res* 2009;15:6683-93.
150. Preusser M, Charles Janzer R, Felsberg J, *et al.* Anti-O6-methylguanine-methyltransferase (MGMT) immunohistochemistry in glioblastoma multiforme: observer variability and lack of association with patient survival impede its use as clinical biomarker. *Brain Pathol* 2008;18:520-32.

ANEXO

Acta Neuropathol
DOI 10.1007/s00401-013-1130-9

ORIGINAL PAPER

Codeletion of 1p and 19q determines distinct gene methylation and expression profiles in *IDH*-mutated oligodendroglial tumors

Pilar Mur · Manuela Mollejo · Yolanda Ruano · Ángel Rodríguez de Lope · Concepción Fiaño · Juan Fernando García · Javier S. Castresana · Aurelio Hernández-Laín · Juan A. Rey · Bárbara Meléndez

Received: 26 February 2013 / Revised: 8 May 2013 / Accepted: 9 May 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract Oligodendroglial tumors (OTs) are primary brain tumors that show variable clinical and biological behavior. The 1p/19q codeletion is frequent in these tumors, indicating a better prognosis and/or treatment response. Recently, the prognostically favorable CpG island methylator phenotype (CIMP) in gliomas (G-CIMP+) was associated with mutations in the *isocitrate dehydrogenase 1* and *isocitrate dehydrogenase 2 (IDH)* genes, as opposed to G-CIMP- tumors, highlighting the relevance of epigenetic mechanisms. We performed a whole-genome methylation study in 46 OTs, and a gene expression study of 25 tumors, correlating the methylation and transcriptomic profiles with molecular and clinical variables. Here, we identified two different epigenetic patterns within the previously described main G-CIMP+ profile. Both *IDH* mutation-associated methylation profiles featured one group of

OTs with 1p/19q loss (CD-CIMP+), most of which were pure oligodendrogliomas, and a second group with intact 1p/19q and frequent *TP53* mutation (CIMP+), most of which exhibited a mixed histopathology. A third group of OTs lacking the CIMP profile (CIMP-), and with a wild-type *IDH* and an intact 1p/19q, similar to the G-CIMP- subgroup, was also observed. The three CIMP groups presented a significantly better (CD-CIMP+), intermediate (CIMP+) or worse (CIMP-) prognosis. Furthermore, transcriptomic analyses revealed CIMP-specific gene expression signatures, indicating the impact of genetic status (*IDH* mutation, 1p/19q codeletion, *TP53* mutation) on gene expression, and pointing to candidate biomarkers. Therefore, the CIMP profiles contributed to the identification of subgroups of OTs characterized by different prognoses, histopathologies, molecular features and gene expression signatures, which may help in the classification of OTs.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00401-013-1130-9) contains supplementary material, which is available to authorized users.

P. Mur · M. Mollejo · B. Meléndez (✉)
Molecular Pathology Research Unit, Department of Pathology,
Virgen de la Salud Hospital, Avda. Barber 30, 45004 Toledo,
Spain
e-mail: bmelendez@sescam.jccm.es

M. Mollejo
Department of Pathology, Virgen de la Salud Hospital, Avda
Barber 30, 45004 Toledo, Spain

Y. Ruano · A. Hernández-Laín
Department of Pathology (Neuropathology), 12 de Octubre
University Hospital, Avda de Córdoba s/n, 28041 Madrid, Spain

Á. R. de Lope
Department of Neurosurgery, Puerta del Hierro Hospital,
C/Manuel de Falla no 1, Majadahonda, 28222 Madrid, Spain

Keywords Methylation array · Oligodendroglial tumors · 1p/19q codeletion · *IDH* mutation · CIMP

C. Fiaño
Department of Pathology, University Hospital Complex of Vigo
(C.H.U.V.I.), Rúa Pizarro, 22, 36204 Vigo, Spain

J. F. García
Department of Pathology, MD Anderson International, C/Arturo
Soria 270, 28033 Madrid, Spain

J. S. Castresana
Brain Tumor Biology Unit, University of Navarra School of
Sciences, C/Irunlarrea 1, 31008 Pamplona, Spain

J. A. Rey
IdiPaz Research Unit, La Paz University Hospital, Po de la
Castellana, 261, 28046 Madrid, Spain

Published online: 21 May 2013

 Springer

ANEXO II

PUBLICACIONES EN REVISIÓN.

Pilar Mur, Manuela Mollejo, Teresa Hernández-Iglesias, Ángel Rodríguez de Lope, Javier S. Castresana, Juan F. García, Concepción Fiaño, Teresa Ribalta, Juan A. Rey, B. Meléndez **“Molecular classification defines four prognostically distinct glioma groups irrespective of diagnosis and grade”**. The Journal of Neuropathology & Experimental Neurology.

Pilar Mur, Ángel Rodríguez de Lope, Francisco Javier Díaz-Crespo, T. Hernández-Iglesias, Teresa Ribalta, Concepción Fiaño, Juan Fernando García, Juan Antonio Rey, Manuela Mollejo, Bárbara Meléndez. **“Impact on prognosis of the regional distribution of MGMT methylation with respect to the CpG island methylator phenotype and age in glioma patients”**. Journal of Neuro-Oncology.

